

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

QUEZIA ROCHA NAVARRO

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Cattleya warneri* T. MOORE: EFEITO DA
MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* (CHODAT) E. HEGEWALD & A. W. F.
SCHMIDT, DAS POLIAMINAS E DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO
VEGETAL

CURITIBA

2020

QUEZIA ROCHA NAVARRO

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Cattleya warneri* T. MOORE: EFEITO DA
MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* (CHODAT) E. HEGEWALD & A. W. F.
SCHMIDT, DAS POLIAMINAS E DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO
VEGETAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas

Coorientador: Dr. Diego de Oliveira Corrêa

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Navarro, Quezia Rocha

Propagação *in vitro* de *Cattleya wameryi* T. Moore : efeito da microalga *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E. Hegewald & A. W. F. Schmidt, das poliaminas e dos reguladores de crescimento vegetal. / Quezia Rocha Navarro. – Curitiba, 2020.

132 p.: il.

Orientador: Luciana Lopes Fortes Ribas.

Coorientador: Diego de Oliveira Corrêa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Orquídea. 2. Epífitas. 3. Germinação. 4. Microalga. 5. I. Título. II. Ribas, Luciana Lopes Fortes, 1964-. III. Corrêa, Diego de Oliveira, 1986-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (22. ed.) 584.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BOTÂNICA -
40001016004P9

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **QUEZIA ROCHA NAVARRO** intitulada: **Propagação *in vitro* de *Cattleya Warneri* T. Moore: efeito da microalga *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E. Hegewald & A. W. F. Schmidt, das poliaminas e dos reguladores de crescimento vegetal**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA LOPES FORTES RIBAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

03/12/2020 12:28:24.0

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/12/2020 07:35:53.0

LUIZ ANTONIO BIASI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/12/2020 10:17:55.0

ROSETE PESCADOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

CENTRO POLITECNICO - Curitiba - Paraná - Brasil

CEP 81531980 - Tel: (41) 3361-1625 - E-mail: pgbotanica.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 64565

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 64565

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas e ao meu coorientador Dr. Diego de Oliveira Corrêa pela orientação. Sou muito grata pela atenção, paciência e compreensão a mim dedicadas. Pelos conhecimentos transmitidos, pelas correções, sugestões e pela preocupação em melhorar sempre meu trabalho.

Ao Professor Dr. Alexandre Behling por toda ajuda e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação Vegetal e em especial a Joana e a Fabricia pelo apoio nos trabalhos do laboratório.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos a mim concedida por 26 meses.

E principalmente aos meus pais e ao meu irmão pelo amor e dedicação e conselhos, por sempre me incentivarem a seguir em frente e nunca desistir.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para que eu continuasse minha jornada durante esses dois anos e concluísse o meu trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

Cattleya warneri pertence à família Orchidaceae e é uma espécie epífita, endêmica da Mata Atlântica, que apresenta alto potencial ornamental. A germinação de sementes na natureza é muito difícil, pois são microscópicas, não apresentam endosperma e dependem de fungos micorrízicos específicos para germinar. Em função dessas características reprodutivas, a germinação assimbiótica ou *in vitro* de orquídeas é uma alternativa eficiente para produção de mudas e conservação de espécies. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da microalga *Desmodesmus subspicatus* na germinação assimbiótica e também das poliaminas e de reguladores de crescimento vegetais na micropropagação, utilizando a técnica “thin cell layer” (TCL) para a produção de mudas em grande escala de *Cattleya warneri*. Sementes foram germinadas em meio de cultura MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade (MSM/2), suplementado com: 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de biomassa ou de extrato aquoso de *D. subspicatus*. A adição de biomassa ou extrato (0,25 g L⁻¹) da microalga acelerou a germinação. Após 24 semanas da semeadura foram observadas altas porcentagens de formação de plântulas (superior a 90%) em todos os tratamentos com biomassa e com adição de 0; 0,25 e 0,5 g L⁻¹ de extrato. O meio MSM/2, semi-sólido, com adição de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado foi recomendado para induzir alongamento e desenvolvimento de raízes. O cultivo de explantes em meio dupla-fase (fina camada de meio líquido, contendo 0,5 a 2 g L⁻¹ de extrato sobre o meio semi-sólido) possibilitou um aumento no número de brotos devido a presença de zeatina na composição do extrato. A aclimatização de mudas utilizando esfagno como substrato foi eficiente (superior a 80% de sobrevivência), recomendando-se pulverização por quatro meses com 2 g L⁻¹ de biomassa ou 1 g L⁻¹ de extrato da microalga. Protocormos (90 a 120 dias) obtidos da germinação *in vitro* em meio MSM/2 foram utilizados como explantes para os experimentos de TCL. Secções transversais (TCLts) apicais e basais e longitudinais (TCLls) foram comparadas com protocormos inteiros. Foram avaliados os efeitos dos reguladores de crescimento vegetais: 6-benzilaminopurina (BAP: 0; 4; 8 ou 16 µM) combinado com ácido α-naftaleno acético (ANA: 0; 2 e 4 µM); das poliaminas (PAs): putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mM) e da biomassa ou extrato de *D. subspicatus* (0; 0,25 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹) na indução e regeneração de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs). Os explantes obtidos da técnica TCL foram cultivados em meio MSM/2, contendo carvão ativado (0, 1, 2 e 4 g L⁻¹) para estimular o alongamento e desenvolvimento de raízes. As mudas foram transplantadas em bandejas de semeadura, com diferentes substratos: esfagno, vermiculita, casca de pinus, carvão vegetal, fibra de coco, Maxfertil® e Forth®. Os resultados indicaram que os TCLts apicais foram os explantes mais responsivos nos meios contendo reguladores vegetais, PAs e microalgas. Os protocormos inteiros foram eficientes para a regeneração de plantas. As melhores respostas de regeneração de ESPs ocorreram com adição de 8 µM de BAP (89,58% e 5,2 ESPs); com 0,75 mM de Spd (100% e 2,3 ESPs) e com 1,5 g L⁻¹ de biomassa (92% e 4,7 ESPs) ou 1,0 g L⁻¹ do extrato (100% e 3,3 ESPs) da microalga no meio de cultura MSM/2. A adição de biomassa ou extrato de *D. subspicatus* no meio de cultura pode substituir os reguladores do crescimento vegetais clássicos (BAP e ANA) na indução e regeneração de ESPs. Protocormos inteiros também podem ser utilizados na técnica TCLt apical, com adição de 1,0 g L⁻¹ de biomassa (70% e 4,0 ESPs). A adição de 3 g L⁻¹ de carvão ativado é recomendada para promover alongamento da

parte aérea e enraizamento. As plantas foram aclimatizadas com sucesso (porcentagem de sobrevivência maior de 80%) em todos os substratos testados, após 120 dias em casa de vegetação. Foi desenvolvido um protocolo completo e eficiente de germinação assimbiótica, de desenvolvimento de plântulas e de micropropagação utilizando a técnica TCL, a partir de protocormos, com o uso de reguladores do crescimento vegetais, PAs e biomassa ou extrato da microalga *D. subspicatus* que permitiu a propagação massal de plantas de *C. warneri*.

Palavras-chave: Bioestimulante. Germinação assimbiótica. Orquídea epífita. Micropropagação. “Thin cell layer”.

ABSTRACT

Cattleya warneri belongs to the Orchidaceae family and is an epiphytic species, endemic to the Atlantic Forest of Brazil, with high ornamental potential. Seed germination in nature is very difficult, as seeds are microscopic, have no endosperm and depend on specific mycorrhizal fungi to germinate. As a result of these reproductive characteristics, asymbiotic or *in vitro* germination of orchids is an efficient alternative for seedling production and species conservation. The aim of this study was to evaluate the effect of *Desmodesmus subspicatus* microalga on asymbiotic germination as well as polyamines (PAs) and plant growth regulators (PGRs) on micropropagation, using the thin cell layer (TCL) technique for large-scale production of *Cattleya warneri* seedlings. Seeds were germinated in MS culture medium, with the macronutrient concentration reduced by half (MSM/2) and supplemented with 0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 g L⁻¹ of *D. subspicatus* biomass or aqueous extract. The addition of 0.25 g L⁻¹ microalga biomass or extract accelerated the germination. After 24 weeks of sowing, high percentages of seedling formation (greater than 90%) were achieved in all treatments containing biomass and with 0, 0.25, 0.5 g L⁻¹ of the extract. Elongation and root development were induced in semi-solid MSM/2 medium, supplemented with 2.0 g L⁻¹ of activated charcoal. The shoot number of explants cultivated in a double-phase medium (a thin layer of liquid medium, containing 0.5 to 2 g L⁻¹ of extract, above the semi-solid medium) was increased due to the presence of zeatin in the extract composition. The seedlings were successfully acclimatized (with a survival rate greater than 80%) using sphagnum as a substrate, followed by foliar sprays with 2 g L⁻¹ of biomass or 1 g L⁻¹ of microalga extract for four months. Protocorms (90 to 120 days) from *in vitro* germination cultivated in MSM/2 medium were used as explants for the TCL experiments. Apical and basal transverse sections (tTCLs), longitudinal sections (ITCLs) and entire protocorms were compared. The effects of PGRs (0, 4, 8 or 16 µM 6-benzylaminopurine - BAP, combined with 0, 2 and 4 µM naphthalene acetic acid - NAA), of PAs: putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) (0, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.5 mM) and of *D. subspicatus* biomass or extract (0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 g L⁻¹) on protocorm-like bodies (PLBs) regeneration were evaluated. The explants were transferred to MSM/2 medium supplemented with activated charcoal (0, 1, 2 and 4 g L⁻¹) to induce elongation and root development. The seedlings were transplanted into sowing trays, with different substrates: sphagnum, vermiculite, pine bark, charcoal, coconut fiber, and Maxfertil® or Forth®. The apical tTCLs cultivated in a medium supplemented with PGRs, PAs and microalgae were the most responsive explants. Entire protocorms were efficient for plant regeneration. The best responses of PLB regeneration were achieved with the addition of 8 µM BAP (89.58% and 5.2 PLBs), 0.75 mM Spd (100% and 2.3 PLBs), 1.5 g L⁻¹ of biomass (92% and 4.7 PLBs) or 1.0 g L⁻¹ of microalgae extract (100% and 3.3 PLBs) into the MSM/2 culture medium. The addition of microalga extract or biomass to the medium can replace the addition of conventional PGRs for PLB induction and regeneration. Entire protocorms can also be used in the apical tTCL technique, adding 1.0 g L⁻¹ of biomass (70% and 4.0 PLBs) to the medium. The activated charcoal (3 g L⁻¹) is recommended to induce elongation and rooting, and the plants were successfully acclimatized (survival rate higher than 80%) in all tested substrates, after 120 days in the greenhouse. A complete and efficient protocol for asymbiotic germination, seedling development and micropropagation, applying the TCL technique for protocorms, was achieved adding

PGRs, PAs or microalga into the MSM/2 culture medium resulting in mass propagation of *C. warneri* plants.

Keywords: Bioestimulant. Asymbiotic germination. Epiphytic orchids.
Micropropagation. Thin cell layer.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

FIGURA 1 – ASPECTO DA FLOR DE <i>Cattleya warneri</i>	25
FIGURA 2- MICROSCOPIA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	28

CAPITULO 1

FIGURA 1 – ESTADIOS DE DESENVOLVIMENTO DE <i>Cattleya warneri</i>	46
FIGURA 2 – PORCENTAGEM DE PROTOCORMOS CLOROFILADOS (= GERMINAÇÃO) DE <i>Cattleya warneri</i> , OBTIDOS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, SUPLEMENTADOS COM: BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> , APÓS 4 E 8 SEMANAS.....	51
FIGURA 3 – PORCENTAGEM DE PLÂNTULAS DE <i>Cattleya warneri</i> , CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 E SUPLEMENTADOS COM BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> , APÓS 12 E 24 SEMANAS.....	55
FIGURA 4 - PORCENTAGEM TOTAL DE SEMENTES GERMINADAS DE <i>Cattleya warneri</i> CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, SUPLEMENTADO COM BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> APÓS: QUATRO, OITO, DOZE, DEZESSEIS, VINTE E VINTE E QUATRO SEMANAS DA SEMEADURA <i>IN VITRO</i>	58
FIGURA 5 - GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Cattleya warneri</i> EM MEIO MSM/2, COM ADIÇÃO DE BIOMASSA OU EXTRATO DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> , APÓS 24 SEMANAS DE CULTIVO.....	59
FIGURA 6 - ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DE <i>Cattleya warneri</i> , CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2, SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L ⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO +10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM ADIÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L ⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....	61
FIGURA 7 - MASSA FRESCA E BROTAÇÕES DE <i>Cattleya warneri</i> , CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2, SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L ⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO +10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM ADIÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L ⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....	62
FIGURA 8 - ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DE <i>Cattleya warneri</i> , CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2 SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L ⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM EXTRATO DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L ⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....	64

FIGURA 9 - *Cattleya warneri*, CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2 SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM EXTRATO DE *Desmodesmus subspicatus* (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....65

FIGURA 10 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodesmus subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....67

FIGURA 11 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA, MSM/2, SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodesmus subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....68

FIGURA 12 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA, MSM/2 SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodesmus subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....70

FIGURA 13 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA, MSM/2 SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodesmus subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.....71

FIGURA 14 - ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DE *Cattleya warneri* APÓS QUATRO MESES EM CASA DE VEGETAÇÃO.....72

CAPITULO 2

FIGURA 1 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.....107

FIGURA 2 - RESPOSTAS DE ENRAIZAMENTO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO

EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.....108

FIGURA 3 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.....110

FIGURA 4 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.....111

FIGURA 5 - REGENERAÇÃO DE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MSM/2112

FIGURA 6 - ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE ESPs ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS ORIUNDOS DA TCL DE PROTOCORMOS DE *Cattleya warneri* CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, ACRESCIDO DE 0, 1, 2 e 4 g L⁻¹ CARVÃO ATIVADO.....114

FIGURA 7 - ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES ORIUNDOS DE TCL ("THIN CELL LAYER") DE PROTOCORMOS DE *Cattleya warneri* CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, ACRESCIDO DE 0, 1, 2 e 4 g L⁻¹ CARVÃO ATIVADO.....115

FIGURA 8 - ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri* ORIUNDOS DE EXPERIMENTO DE TCL, COM ADIÇÃO DE BIOMASSA E EXTRATO DE *Desmodesmus subspicatus* E CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 e ACRESCIDO DE 0, 1, 2 e 4 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO.....116

FIGURA 9 – ALONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri* ORIUNDOS DOS EXPERIMENTOS DE TCL ("THIN CELL LAYER") APÓS 120 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.....119

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA E EXTRATO AQUOSO DE *Desmodesmus subspicatus*.....49

TABELA 2 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cattleya warneri*, CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* E PERÍODOS DE SEMEADURA.....53

TABELA 3 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cattleya warneri*, CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* E PERÍODOS DE SEMEADURA.....54

CAPITULO 2

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA SECA E EXTRATO AQUOSO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.....96

TABELA 2 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO BAP E ANA.....99

TABELA 3 – RESPOSTAS DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS EM PROTOCORMOS INTEIROS E DO NUMERO MÉDIO DE RAIZES DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO BAP E ANA.....100

TABELA 4 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs, EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO PUTRESCINA.....101

TABELA 5 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO PUTRESCINA.....101

TABELA 6 - RESPOSTAS DO TIPO DE EXPLANTE NO ENRAIZAMENTO DE ESPs DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO PUTRESCINA.....102

TABELA 7 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMINA.....102

TABELA 8 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMINA.....103

TABELA 9 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E NÚMERO MÉDIO DE RAIZES EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMIDINA....104

TABELA 10 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs, EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMIDINA.....104

TABELA 11 - RESPOSTAS DO TIPO DE EXPLANTE NO ENRAIZAMENTO E DO NUMERO MEDIO DE ESPs EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO ESPERMIDINA.....105

TABELA 12 – SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri*, ORIUNDAS DE TCLs CULTIVADOS EM MEIO MSM/2, CONTENDO REGULADORES VEGETAIS, SEGUIDO DE ALONGAMENTO COM ADIÇÃO DE CARVÃO VEGETAL NO MEIO DE CULTURA MSM/2, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 120 DIAS.....117

TABELA 13 – SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri*, ORIUNDAS DE TCLs CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO POLIAMINAS, ALONGADAS COM ADIÇÃO DE CARVÃO ATIVADO, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 120 DIAS.....117

TABELA 14 – SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri*, ORIUNDAS DE TCLs CULTIVADOS EM MEIO MSM/2, CONTENDO MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*, ALONGADAS EM MEIO COM CARVÃO ATIVADO, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 120 DIAS.....118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo geral	22
1.1.2	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	ORCHIDACEAE	24
2.1.1	Cattleya warneri	24
2.2	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	26
2.3	BIOESTIMULANTES.....	26
2.3.1	Microalgas	27
2.4	“THIN CELL LAYER” (TCL).....	28
2.4.1	Reguladores de crescimento vegetais.....	29
2.4.2	Poliaminas.....	30
2.5	ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO.....	30
2.5.1	Efeito do carvão ativado	31
2.6	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO.....	31
3	REFERÊNCIAS	33
	CAPÍTULO I.....	39
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1	LOCAL DE ESTUDO.....	43
2.2	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO AQUOSA.....	43
2.2.1	Composição da biomassa seca e extrato aquoso da microalga.....	44
2.3	MATERIAL VEGETAL	45
2.3.1	TESTE DO TETRAZÓLIO (TZ)	45
2.3.2	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	45
2.4	ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES.....	46
2.5	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS.....	47
2.6	MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	48
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3	RESULTADOS.....	49
3.1	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA	49

3.2	TESTE DE VIABILIDADE DO TETRAZÓLIO	50
3.3	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	50
3.3.1	Efeito da biomassa de <i>D. subspicatus</i> na germinação de <i>C. warneri</i> , após diferentes períodos de semeadura	52
3.3.2	Efeito do extrato de <i>D. subspicatus</i> na germinação <i>in vitro</i> de <i>C. warneri</i> , após diferentes períodos de semeadura	53
3.3.3	Comparação do efeito da adição de biomassa e extrato na germinação assimbiótica.....	56
3.4	ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO	59
3.4.1	Efeito da consistência do meio de cultura e da biomassa de <i>D. subspicatus</i> ...	59
3.4.2	Efeito da consistência do meio de cultura e adição de extrato de <i>Desmodemus subspicatus</i>	62
3.5	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS	65
4	DISCUSSÃO	73
5	CONCLUSÕES	79
6	REFERÊNCIAS	80
	CAPÍTULO II	84
1	INTRODUÇÃO	86
2	MATERIAIS E METODOS	89
2.1	LOCAL DE ESTUDO	89
2.2	PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO AQUOSA.....	89
2.3	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E EXTRATO MICROALGAIS	90
2.4	MATERIAL VEGETAL	91
2.5	TESTE DO TETRAZÓLIO (TZ)	91
2.6	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	91
2.7	“THIN CELL LAYER”	92
2.7.1	Efeito de reguladores do crescimento vegetais e poliaminas (PAs) na regeneração de ESPs	92
2.7.2	Efeito da biomassa ou extrato aquoso de microalga na regeneração de ESPs	
	93	
2.7.3	Subcultivos e avaliação dos experimentos com TCL	93
2.8	ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES.....	93
2.9	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO	93
2.10	MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	94

2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
3	RESULTADOS	95
3.1	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA	95
3.2	TESTE DE VIABILIDADE DO TETRAZÓLIO (TZ) E GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	96
3.3	“THIN CELL LAYER”	96
3.3.1	Efeito dos reguladores do crescimento vegetais (BAP e/ou ANA) na regeneração de ESPs	96
3.3.2	Efeitos das PAs na regeneração de ESPs	100
3.3.3	Efeito da biomassa ou do extrato de <i>D. subspicatus</i> na regeneração de ESPs 105	
3.4	EFEITO DO CARVÃO ATIVADO NO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO ..	113
3.4.1	Explantes oriundos de TCLs cultivados com reguladores do crescimento vegetais	113
3.4.2	Explantes oriundos de TCLs cultivados com PAs	114
3.4.3	Explantes oriundos de TCL cultivados com biomassa e extrato aquoso da microalga <i>D. subspicatus</i>	115
3.5	TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS	116
3.5.1	Explantes oriundos de TCLs cultivados com reguladores de crescimento vegetais e alongados com carvão ativado.	116
3.5.2	Explantes oriundos de TCLs cultivados com poliaminas e alongados com carvão ativado.	117
3.5.3	Explantes oriundos de TCLs cultivados com biomassa e extrato de <i>D.</i> <i>subspicatus</i> e alongados com carvão ativado.	118
4	DISCUSSÃO	120
5	CONCLUSÕES	124
6	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO GERAL

Cattleya warneri pertence à família Orchidaceae e é uma espécie epífita, endêmica da Mata Atlântica, que ocorre no Nordeste, no estado da Bahia e Sudeste, nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (FLORA DO BRASIL 2020, em construção). Apresenta alto potencial ornamental, com as maiores flores entre todas as espécies brasileiras do gênero e as suas pétalas e sépalas variam da cor rosa claro a lilás, labelo rosa com a parte interna branca amarelada (FLORA DO BRASIL 2020, em construção). Devido à beleza de suas flores, as espécies de orquídeas apresentam grande importância econômica e são intensamente coletadas e com isso vêm sofrendo grande extrativismo da natureza para fins lucrativos. Levando-se em conta sua distribuição restrita e seu habitat fragmentado, a espécie encontra-se classificada como "Vulnerável" (CNCFlora, 2012). Para evitar que essa espécie seja extinta, estudos de propagação são necessários para produzir mudas em grande escala e para que no futuro próximo também possa ocorrer sua reposição no habitat natural.

A germinação de sementes de orquídeas na natureza é muito difícil, pois apresentam sementes microscópicas, as quais não apresentam endosperma como tecido de reserva e dependem de fungos micorrízicos específicos para germinar, impedindo que as espécies se propaguem de maneira eficiente (GUPTA, 2016). Em função dessas características reprodutivas, a germinação assimbiótica ou *in vitro* de orquídeas é uma alternativa eficiente para produção de mudas (CARDOSO *et al.*, 2020). As sementes são colocadas em meios de cultura apropriados para germinar, sendo que a primeira estrutura formada a partir do embrião é chamada de protocormo, que posteriormente irá formar a plântula (YEUNG, 2017). Vários tipos de explantes podem ser utilizados na micropropagação de orquídeas, sendo que os protocormos vêm sendo recomendados devido à capacidade de suas células em se dividir (YEUNG, 2017) e quando seccionados dão origem a estruturas semelhantes à protocormos (ESPs), que podem multiplicar ou se desenvolver formando plântulas (CHUGH *et al.*, 2009).

Existem muitos estudos para determinar a melhor formulação de meio de cultura para a germinação assimbiótica e micropropagação de orquídeas, ocorrendo muita variação conforme a espécie. Os meios mais utilizados são KC (KNUDSON,

1946), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e MS/2, com a concentração de sais ou de macronutrientes reduzida pela metade (MSM/2).

A propagação massal de orquídeas vem sendo proposta utilizando técnicas de micropropagação, sendo que as convencionais nem sempre apresentam respostas satisfatórias. O surgimento da tecnologia “*thin cell layer*” (TCL) tornou a propagação clonal de orquídeas mais fácil e mais reproduzível. Essa técnica consiste em realizar secções finas em explantes de diferentes órgãos da planta (protocormos, caules, folhas, flores ou órgãos florais, cotilédones, hipo/ epicótilo, ou embrião), seja longitudinalmente (TCLl) (0,5 a 1 mm de largura e 5-10 mm de comprimento), ou transversalmente (TCLt) (0,1-5 mm) (TEIXEIRA DA SILVA, 2013). A vantagem dessa técnica é aumentar a propagação massal e reduzir o intervalo de tempo necessário para formar plantas (CHUGH *et al.*, 2009).

O sucesso da técnica TCL também depende da escolha de um meio de cultura adequado e da adição de reguladores vegetais, em concentrações apropriadas. Os mais utilizados para indução e multiplicação de ESPs são citocininas, isoladas ou combinadas com auxinas, como por exemplo: benzilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA). Dependendo do tipo de regulador vegetal e da concentração utilizada, o custo do protocolo de produção de mudas pode ser muito elevado. Neste contexto, meios de cultura com suplementos alternativos estão sendo testados como substitutos de reguladores vegetais convencionais para promover o desenvolvimento de plantas com a mesma qualidade fisiológica. Entre esses suplementos, a adição de biomassa ou extrato de microalga da família Chlorophyceae, como também de poliaminas (PAs), começou a ser testada no cultivo *in vitro* de algumas espécies, apresentando resultados promissores. Os produtos derivados de algas marinhas têm sido muito usados em sistemas de cultivo devido à presença de compostos estimuladores de crescimento. As microalgas são capazes de sintetizar hormônios essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, como as auxinas e citocininas (STIRK *et al.*, 2013). Além disso, podem sintetizar lipídios, polissacarídeos e outros produtos celulares, como as poliaminas, necessários para o desenvolvimento das plantas (CAZZANIGA *et al.*, 2014; BURCZYK *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018).

As PAs: espermidina (Spd), espermina (Spm) e putrescina (Put), são pequenas aminas alifáticas, as quais estão presentes em todas as células vegetais,

podendo atuar como reguladoras na proliferação e diferenciação celular (BOUCHEREAU, 1999). As poliaminas também podem se tornar bons substitutos dos reguladores vegetais, pois quando aplicados exogenamente podem induzir o crescimento, e aumentar a produtividade das plantas (CHEN *et al.*, 2019). As PAs também vêm sendo utilizadas para acelerar o desenvolvimento de culturas *in vitro* e em estudos de organogênese e embriogênese somática de muitas espécies (BARON e STASOLLA, 2008). Sendo assim, a suplementação dos meios de cultura com esses compostos poderá tornar o protocolo de produção de mudas de *C. warneri* mais eficiente.

A última etapa da micropropagação é a de transplântio e aclimatização de mudas, sendo necessários cuidados especiais para obtenção de elevadas porcentagens de sobrevivência. Esta etapa consiste em retirar as plantas da condição *in vitro*, onde se desenvolviam em meios de cultura com sacarose e nutrientes e eram mantidas em sala de crescimento com baixa luminosidade e transferi-las para casa de vegetação, com condições de menor umidade, onde estarão sujeitas às variações de temperatura e luminosidade (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2017). Durante a fase de aclimatização das orquídeas, é preciso selecionar substratos adequados que permitam o desenvolvimento dessas plantas. Vários substratos vêm sendo utilizados, como por exemplo, xaxim desfibrado, fibra de coco, pó de coco, casca de pinus e esfagno (ZANDONA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016; WATTANAPAN *et al.*, 2018). A pulverização de plantas de orquídeas com biomassa de algas (0,1 – 0,2 g L⁻¹) também apresentou efeito positivo na aclimatização de *Phalaenopsis*, *Paphiopedilum* e *Oncidium* (Virág *et al.*, 2011) e pode ser uma alternativa para substituir os fertilizantes químicos que poluem o ambiente.

Existem alguns estudos de germinação assimbiótica e da técnica TCL para espécies de *Cattleya*. No entanto, são escassos os que utilizam suplementos alternativos nos meios de cultura, como: biomassa ou extrato de microalga ou poliaminas. Sendo assim, a viabilidade do uso desses compostos precisa ser testada na germinação *in vitro* e micropropagação, visando aumentar a eficiência do protocolo de produção massal de mudas de *C. warneri*. Com isso, poderá evitar que essa espécie com grande potencial como ornamental sofra ameaça de extinção pela coleta indiscriminada e destruição de seu habitat.

O presente estudo foi dividido em dois capítulos, um no qual foi avaliado o efeito da biomassa e extrato da microalga *D. subspicatus*, desde a germinação até a aclimatização de plantas de *C. warneri* e no outro foi testado o efeito da mesma microalga, de PAs ou de reguladores vegetais em protocormos de *C. warneri* utilizando a técnica TCL.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição de biomassa ou do extrato da microalga *D. subspicatus* na germinação assimbiótica e também das poliaminas e de reguladores vegetais na micropropagação utilizando a técnica “thin cell layer” para produção de mudas em grande escala de *C. warneri*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da biomassa e do extrato da microalga *D. subspicatus* na germinação assimbiótica e nas etapas de micropropagação utilizando a técnica TCL;
- Definir a melhor concentração e tipo de reguladores vegetais (citocininas e/ou auxinas), isolados ou combinados e de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) nas etapas de regeneração de ESPs;
- Verificar se a adição da biomassa ou do extrato de microalgas e de poliaminas pode substituir a adição de reguladores vegetais na técnica TCL;
- Determinar o melhor tipo de secção (longitudinal ou transversal) dos protocormos para a regeneração de ESPs;
- Verificar se a adição de carvão ativado promove o alongamento da parte aérea e o desenvolvimento de raízes e

- Selecionar um substrato para transplante e verificar se as pulverizações com biomassa ou extrato de microalga *D. subspicatus* aceleram o desenvolvimento de plantas durante a aclimatização de *C. warneri* em casa de vegetação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORCHIDACEAE

Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas com flores, com cerca 28.000 espécies divididas em cinco subfamílias. Representam 8% da diversidade de espécies de angiospermas (FAY, 2018). No entanto, apenas 1000 espécies foram avaliadas para a Lista Vermelha Global da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) e 56,5% das que foram avaliadas se enquadram em uma das categorias de ameaça (criticamente em perigo, em perigo e vulnerável). As principais ameaças incluem a destruição do habitat e a colheita insustentável (muitas vezes ilegal) e, devido à sua complexa história de vida, as orquídeas são consideradas particularmente vulneráveis aos efeitos das mudanças ambientais globais (CHASE *et al.*, 2015; FAY, 2018).

A coleta não regulamentada de orquídeas para fins comerciais e fitoterápicos agravou ainda mais o problema. Como resultado, a maioria das orquídeas tem se tornado um objeto de preocupação para os conservacionistas devido à sua alta sensibilidade a alterações em seu ambiente (GUPTA, 2016).

As orquídeas são conhecidas por suas flores primorosas e duradouras, que as tornam mais bonitas entre as plantas ornamentais e por apresentarem um alto valor econômico atraem o interesse de muitas pessoas (SIPAYUNG *et al.*, 2018). São caracterizadas por um sistema de polinização altamente especializado, as suas sementes são pequenas, finas e não endospermicas, além da exigência obrigatória de associações micorrízicas para germinar. Ocorrem em habitats diversificados e cosmopolitas (GUPTA, 2016). Além de sua aplicação na horticultura, muitas espécies de orquídeas, vêm sendo utilizadas como medicamentos ou alimentos (FAY, 2018).

2.1.1 *Cattleya warneri*

O gênero *Cattleya* sp. apresenta flores com uma ampla diversidade de tamanhos, formas e cores devido ao seu valor ornamental todas as espécies tem sido coletadas intensamente na natureza para cultivo (CRUZ *et al.*, 2003), além dos híbridos naturais e os obtidos artificialmente, se tornando uma prática padrão no

agronegócio (TAMBARUSSI *et al.*, 2017). De todos os gêneros de orquídeas cultivadas, *Cattleya* sp. e seus híbridos são os mais populares e desejados pelos consumidores (COLOMBO *et al.*, 2017).

Cattleya warneri é uma espécie com ocorrência em Mata Atlântica, com registros nos Estados da Bahia e Espírito Santo. É uma espécie epífita com uma das maiores flores do gênero, e por isso muito visada como ornamental com um elevado valor de mercado (FIGURA 1). Por essa razão é severamente coletada e bastante difícil de encontrar na natureza. Há muito tempo vem sofrendo grande extrativismo da natureza para fins lucrativos; além disso, tem como ameaça a destruição de seu habitat. Suspeita-se que se não houver fiscalização e ações de conservação, ela poderá sofrer uma redução populacional de 30% nos próximos 30 anos. Levando-se em conta sua distribuição restrita e seu habitat fragmentado, a espécie encontra-se "Vulnerável" (VU) (CNCFlora, 2012).

É bastante similar a *Cattleya labiata*, que é a espécie-tipo do gênero, da qual difere pela floração no final da primavera do broto recém-formado sem passar por um período de repouso, seguido da emissão de raízes após a floração, distribuição geográfica disjunta, e morfológicamente porte um pouco mais robusto, crescimento mais desordenado, e flores em geral maiores (CNCFlora, 2012).

FIGURA 1 – ASPECTO DA FLOR DE *Cattleya warneri*



FONTE: Rogério Suzuki (2020).

2.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

As sementes de orquídeas são colocadas em meios de cultura apropriados para germinar, sendo que a primeira estrutura formada a partir do embrião é chamada de protocormo que posteriormente irá formar a plântula (YEUNG, 2017). Existem muitos estudos para determinar a melhor formulação de meio de cultura para a germinação assimbiótica de orquídeas, demonstrando muita variação conforme a espécie. Os meios mais utilizados são KC, MS e MS/2, com a concentração de sais ou de macronutrientes reduzida pela metade (MSM/2). O meio MS é amplamente usado para dicotiledôneas e monocotiledôneas e é um bom meio de regeneração de plantas, devido concentrações elevadas de nitrogênio (PHILLIPS e GARDA, 2019).

O meio MS e suas variações, com concentração de sais reduzida pela metade (MS/2) ou de macronutrientes reduzidos pela metade (MSM/2) foram recomendadas para espécies de orquídeas do gênero *Cattleya*, como: *Cattleya violacea* (GALDIANO JÚNIOR *et al.*, 2013), *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri* (SCHNEIDER *et al.*, 2014; JORGE *et al.*, 2015), *Cattleya harrisoniana*, *Cattleya forbesii* (SCHNEIDERS *et al.*, 2012) e *Cattleya bowringiana* (PALAORO *et al.*, 2018).

2.3 BIOESTIMULANTES

Os bioestimulantes são produtos derivados de matéria orgânica que, aplicados em pequenas quantidades, são capazes de estimular o crescimento e o desenvolvimento de diversas culturas, tanto em condições ideais, como também em de estresse (RONGA *et al.*, 2019). Compostos bioativos com propriedades atrativas são abundantes em microalgas, incluindo pigmentos, carboidratos, vitaminas, proteínas, carboidratos e lipídios (HAN *et al.*, 2018). Esses compostos podem ser utilizados como reguladores de crescimento vegetal, gerando benefícios, no enraizamento, promovendo maior rendimento e qualidade das culturas, além de tolerância à seca e a salinidade (RONGA *et al.*, 2019).

Biomassa e extrato de microalgas apresentaram efeito positivo em culturas *in vitro* de *Cattleya labiata*, utilizando a técnica TCL, indicando que podem substituir a adição de reguladores de crescimento convencionais. Corbellini *et al.* (2020) recomendaram adição de 4 g L⁻¹ de biomassa de *Messastrum gracile* ao meio MS/2,

com 59% de regeneração de ESPs e 4 ESPs por explante. VIRÁG *et al.* (2011) recomendaram aplicações foliares com 0,1 – 0,2 g L⁻¹ de biomassa de cepas de algas, no início da aclimatização de *Phalaenopsis* e *Oncidium*.

Extratos de algas também apresentaram um efeito positivo na germinação de sementes *ex vitro* e no crescimento de plantas de trigo e cevada (KUMAR e SAHOO, 2011) e na germinação *in vitro* de *Nicotiana benthamiana*, videira, ameixa e damasco (ESSERTI *et al.*, 2016). Na germinação de sementes *ex vitro* e desenvolvimento inicial de plantas de cevada e trigo houve um aumento no crescimento da raiz e da parte aérea em meio de cultura contendo 0,06 g L⁻¹ e 0,23 g L⁻¹ da microalga *Chlorella sp.* (ODGEREL e TSERENDULAM, 2016). A porcentagem de germinação de sementes *ex vitro* de agrião aumentou 40% e promoveu o alongamento do caule, com o uso da biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2020).

2.3.1 Microalgas

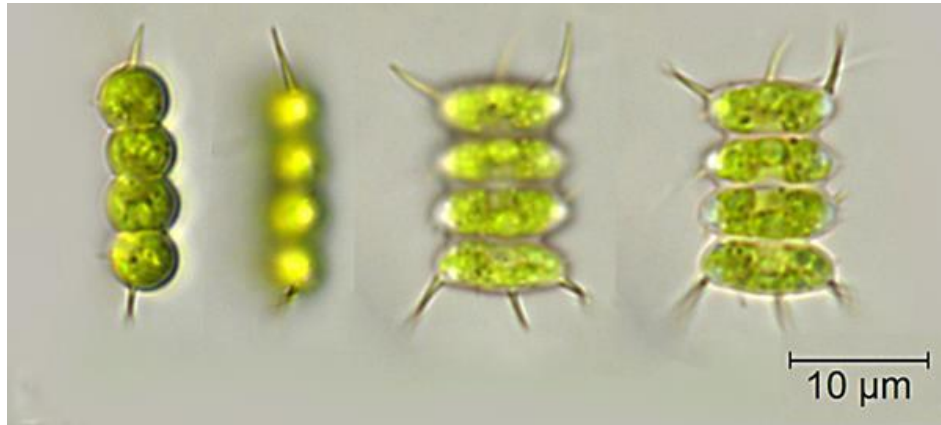
Microalgas são organismos microscópicos presentes não apenas no ecossistema aquático, mas também no terrestre. Representam uma grande variedade de espécies. As microalgas precisam principalmente de três componentes principais para o crescimento, incluindo luz solar, água e fonte de carbono. Elas obtêm nutrientes dos habitats aquáticos, absorvem a luz solar, capturam o CO₂ do ar e produzem cerca de 50% do oxigênio atmosférico. As microalgas possuem um sistema biológico eficiente, capaz de utilizar a luz solar para a produção de compostos orgânicos (RIZWAN *et al.*, 2018; RONGA *et al.*, 2019).

As microalgas são capazes de produzir biomassa que é composta de proteínas, carboidratos, conteúdo de fibras e enzimas. Também podem produzir vitaminas (A, B1, B2, B6 e C) e minerais como iodo, ferro, niacina, potássio, cálcio e magnésio, que pode ser utilizada em diversos setores, tais como: combustíveis, alimentos, ração animal, farmacêutica e produção agrícola (RIZWAN *et al.*, 2018).

D. subspicatus é uma microalga verde, caracterizada por colônias planas retas ou ligeiramente curvas, com células em uma fileira, geralmente com duas, quatro ou oito células, mais raramente 16 ou 32, unidas lateralmente e paralelas umas às outras. Suas células são ovóides a elipsóides, com ápices arredondados e com espinhos ou dentes longos, sua parede celular é granular, espinhosa ou

dentada, com projeções semelhantes a verrugas e/ou costelas presentes e o cloroplasto é parietal com um único pirenoide (FIGURA 2) (CANCELA *et al.*, 2017).

FIGURA 2- MICROSCOPIA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



FONTE: Algaebase (2020).

2.4 “THIN CELL LAYER” (TCL)

A técnica TCL utiliza secções finas ou ultrafinas, normalmente com 0,1–2 mm de espessura. Vários tipos de explantes podem ser utilizados com essa técnica, como: caules, folhas, flores e embriões e dependendo do tipo de secção, se for transversal é denominada TCLt e longitudinal TCLI (TEIXEIRA DA SILVA e DOBRÁNSZKI 2014). Os TCLIs consistem em apenas um ou dois tipos de tecido, como a epiderme e subepiderme, enquanto os TCLts podem ter vários tecidos (TEIXEIRA DA SILVA e DOBRÁNSZKI, 2019).

O explante é o fator mais importante na cultura de tecidos vegetais e seu tamanho, origem e idade determinam sua totipotência (a capacidade de regenerar uma planta inteira a partir de qualquer célula vegetal). O fator importante que diferencia um TCL de um explante convencional é sua relação superfície/ volume, tamanho e espessura (TEIXEIRA DA SILVA e DOBRÁNSZKI, 2014).

As orquídeas são importantes espécies de plantas ornamentais, muitas delas são raras, enquanto algumas têm propriedades medicinais e até mesmo algumas correm o risco de extinção. Assim, a capacidade de ter um sistema de cultura de tecidos capaz de produzir um maior número de propágulos clonais, torna os TCLs atrativos para pesquisadores e para a indústria ornamental. Estudos indicaram que a tecnologia TCL tem sido usada em cultura de tecidos ou

micropropagação de 19 espécies de orquídeas abrangendo 13 gêneros, onde também tem sido usada para a indução de culturas que levam ao florescimento *in vitro* ou indução de embriões somáticos (TEIXEIRA DA SILVA, 2013; TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2014; TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2015).

Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso para propagação de várias espécies de orquídeas, como: *Vanilla planifolia* (JING *et al.*, 2014), *Brasiliidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015), *Dendrobium aphyllum* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2018) e *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve* (WATTANAPAN *et al.*, 2018).

2.4.1 Reguladores de crescimento vegetais

Os fitohormônios são mensageiros químicos, que em concentrações baixas, estão envolvidos em processos fisiológicos e bioquímicos de plantas superiores (HAN *et al.*, 2018).

As técnicas de propagação *in vitro*, como TCL, ocorrem em condições controladas e após a seleção de um explante e meio de cultura adequado são adicionados reguladores de crescimento vegetal. Das citocininas, BAP é a mais usada para indução de brotos e regeneração de ESPs, seguida por TDZ. As auxinas mais usadas são ANA e AIB, que associadas as citocininas promovem indução de brotos ou ESPs e isoladas, induzem enraizamento. As citocininas naturais como a zeatina (ZEA) são caras e menos estáveis quimicamente do que as sintéticas, como BAP. O TDZ é mais frequentemente usado com plantas lenhosas (PHILLIPS e GARDA, 2019).

BAP e ANA, isolados ou combinados, foram eficientes para regeneração e multiplicação de ESPs de várias espécies de orquídeas. Jing *et al.* (2014) recomendaram a adição de 4,44 μM e 17,74 μM de BAP para TCLIs e TCLts respectivamente de *Vanilla planifolia*. A adição de 6,66 μM de BAP ao meio MS resultou no número máximo (7,75) e 81,40 % de regeneração de ESPs de *Cymbidium finlaysonianum*, enquanto o desenvolvimento dos ESPs ocorreu em meio suplementado com 4,4 μM de BAP e 2,15 μM de ANA (ISLAM *et al.*, 2015). Vudala *et al.* (2019) constataram que a concentração ótima de BAP variou conforme a técnica de TCL utilizada em protocormos de dois meses de *Hadrolaelia grandis*. O meio WPM contendo 2,2 μM de BAP foi melhor para regeneração de ESPs (70,8 % e 30,1) em TCLts e 8,8 μM de BAP para TCLIs (83,3% e 34,4 ESPs).

2.4.2 Poliaminas

Poliaminas (PAs) são bases nitrogenadas alifáticas de baixo peso molecular contendo dois ou mais grupos amino. Por desempenharem papéis importantes em diversos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas e nas respostas ao estresse ambiental, são consideradas um novo tipo de bioestimulante vegetal. Existem evidências de que as PAs, aplicadas exogenamente ou produzidas endogenamente por meio de engenharia genética, podem afetar positivamente o crescimento, a produtividade e a tolerância ao estresse das plantas. No entanto, ainda não é totalmente compreendido como as PAs regulam o crescimento das plantas e as respostas ao estresse (ABBASI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019). As poliaminas são conhecidas também por melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas por causa de seus efeitos na divisão e diferenciação das células (ABBASI *et al.*, 2017).

Existem três formas principais de PAs: Put, Spd e Spm. As PAs associadas ou não com reguladores de crescimento vegetais apresentaram um efeito positivo na multiplicação e no crescimento de orquídeas como *Dendrobium* 'Sonia' que a adição de 0,4 mM de Put, associada com 4,44 µM de BAP foi eficiente para estimular a regeneração de ESPs (SAIPRASAD *et al.*, 2004). Além da Put, a adição de Spd (0,4 mM), associada com TDZ e ANA também foi eficiente para aumentar o número de brotações de *Malaxis acuminata* (CHERUVATHUR *et al.*, 2010). A adição de 5 µM de BAP e 25 µM de Spd produziu maior massa fresca para as ESPs de *Spathoglottis plicata* (0,38 g e 0,31 g, respectivamente) (YASIN *et al.*, 2015). BHATTACHARYYA *et al.* (2016) recomendaram o uso de 0,8 mM de Spd e de 0,8 e 1,0 mM de Put, associada com TDZ (9,08 µM) e ANA (2,69 µM) para aumentar o número de brotações de *Dendrobium crepidatum*.

2.5 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO

O alongamento e enraizamento de orquídeas podem ocorrer em um meio sem regulador vegetal ou em meio contendo citocininas e auxinas (PHILLIPS e GARDA, 2019).

2.5.1 Efeito do carvão ativado

O carvão ativado é usado em cultura de tecidos de plantas para melhorar o crescimento e o desenvolvimento das plantas (PAN e VANSTADEN, 1998). A adição de carvão ativado no meio líquido e semi-sólido é uma prática comum devido à sua influência no crescimento e desenvolvimento das plantas. Melhora o enraizamento, o número e o comprimento das raízes. O carvão adsorve certas substâncias inibidoras do meio de cultura produzidas por explantes promovendo o crescimento da cultura *in vitro* (THOMAS, 2008). O carvão ativado foi eficiente na etapa de alongamento de várias espécies de orquídeas como *Brasilidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015), *Gomesa praetexta* e *Grandiphyllum divaricatum* (FRANCESCHI *et al.*, 2019), *Acianthera prolifera* (KOENE *et al.*, 2019) e *Hadrolaelia grandis* (VUDALA e RIBAS, 2017).

2.6 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

A última etapa da micropropagação é a de transplântio e aclimatização de mudas, sendo necessários cuidados especiais para obtenção de elevadas porcentagens de sobrevivência. Esta etapa consiste em retirar as plantas da condição *in vitro*, onde se desenvolviam em meios de cultura com sacarose e nutrientes e eram mantidas em sala de crescimento com baixa luminosidade e transferi-las para casa de vegetação, com condições de menor umidade, onde estarão sujeitas às variações de temperatura e luminosidade (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2017).

Para o transplântio das orquídeas é necessário selecionar substratos adequados que permitam o desenvolvimento dessas plantas. Vários substratos vem sendo utilizados para as orquídeas, como por exemplo, uma mistura de casca de arroz carbonizada + fibra de coco (1:1 v/v) para *Arundina graminifolia* (ZANDONA *et al.*, 2014), fibra de coco para *Oncidium baueri* (RODRIGUES *et al.*, 2016) vermiculita para *Hadrolaelia grandis* (VUDALA *et al.*, 2017), uma mistura comercial de casca de pinus, fibra de coco e carvão ativado combinado com vermiculita (1:1, v/v) para *Acianthera prolifera* (KOENE *et al.*, 2019) e esfagno para *Cattleya labiata* (CORBELLINI *et al.*, 2020).

Pulverizações com microalgas após o transplântio de mudas também têm sido eficiente para acelerar o desenvolvimento de plantas durante a aclimatização, como foi constatado para *Phalaenopsis* e *Oncidium* (VIRÁG *et al.*, 2011).

3 REFERÊNCIAS

- ABBASI, N. A.; ALI, I.; HAFIZ, I. A.; KHAN A. S. Application of polyamines in horticulture: A review. **International Journal of Biosciences**, v. 10, p. 319-342, 2017.
- BARON, K.; STOSOLLA, C. The role of polyamines during in vivo and in vitro development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 44, p. 384 – 395, 2008.
- BHATTACHARYYA, P.; KUMARIA, S.; JOB, N.; TANDON, P. En-masse production of elite clones of *Dendrobium crepidatum*: a threatened, medicinal orchid used in Traditional Chinese Medicine (TCM). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3. p. 168–176, 2016.
- BHATTACHARYYA, P.; PAUL, P.; KUMARIA, S.; TANDON, P.; Transverse thin cell layer (t-TCL)-mediated improvised micropropagation protocol for endangered medicinal orchid *Dendrobium aphyllum* Roxb: an integrated phytomolecular approach. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, p. 1-14, 2018.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103–125, 1999.
- BURCZYK, J.; ZYCHA, M.; IOANNIDIS, N. E.; KOTZABASIS. K. Polyamines in cell walls of Chlorococcalean microalgae. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 69, p. 75–80, 2014.
- CANCELA, Á.; MACEIRA, R.; ALFONSÍN, V.; SÁNCHEZ, Á. A study on techniques for microalgae separation and lipid extraction for *Desmodesmus subspicatus*. **International Journal of Environmental Research**, v.11, p. 387-394, 2017.
- CARDOSO, J. C.; ZANELLO, C. A.; CHEN, J-T. An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. **International Journal Molecular Sciences**, v. 21. p. 1-43, 2020.
- CAZZANIGA, S.; DALL'OSTO, L.; SZAUB, J.; SCIBILIA, L.; BALLOTTARI, M.; PURTON, S.; BASSI, R. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1-13, 2014.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151–174, 2015.
- CHEN, D.; SHAO, Q.; YIN, L.; YOUNIS, A.; ZHENG, B. Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-13, 2019.

CHERUVATHUR, M. K.; ABRAHAM, J.; MANI, B.; THOMAS, T. D. Adventitious shoot induction from cultured internodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable terrestrial medicinal orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 101, p. 163–170, 2010.

CHUGH, S.; GUHA, S.; USHA RAO, I. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.

CNCFlora. *Cattleya warneri* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya warneri](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_warneri)>. Acesso em 31 maio 2020.

COLOMBO, R. C.; HOSHINO, R. T.; FERRARI, E. A. P.; ALVES, G. A. C.; FARIA R. T. *Cattleya forbesii* x *Cattleya bowringiana*: a new hybrid of *Cattleya* orchid. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 184-186, 2017.

CORBELLINI, J. R., RIBAS L. L. F., MAIA F. R., CORRÊA, D. O., NOSEDA M. D., SUZUKI, R. M., AMANO, E. Effect of microalgae *Messastrum gracile* and *Chlorella vulgaris* on the in vitro propagation of orchid *Cattleya labiata*, **Journal of Applied Phycology**, <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02251-9> 2020

CRUZ, D. T.; BORBA, E. L.; VAN DEN BERG, C. O gênero *Cattleya* (Orchidaceae) no estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus**, v. 3 p 26–34, 2003.

DA SILVA, A.; DE MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. Acclimatization of micropropagated plants of *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm. inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **South African Journal of Botany**, v. 113 p. 164–169, 2017.

ESSERTI, S.; FAIZE, M.; RIFAI, L. A.; SMAILI A.; BELFAIZA M.; FAIZE, L.; ALBURQUERQUE, N.; BURGOS, L.; KOUSSA, T.; MAKROUM, K. Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides* and *Fucus spiralis* for in vitro plant tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 128, p. 437-446, 2017.

FAY, M. F. Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? **Botanical Studies**, v. 59, p. 1-6, 2018.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11347>>. Acesso em: 20 de nov. 2020.

FRANCESCHI, C. R. B.; SMIDT, E. C.; VIEIRA, L. N.; RIBAS, L. L. F. Storage and in vitro germination of orchids (Orchidaceae) seeds from Atlantic Forest – Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1-11, 2019.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; CASSANO A. O.; LEMOS, E. G. M. Desenvolvimento inicial e crescimento *in vitro* de *Cattleya violacea* (Kunth) Rolfe em diferentes concentrações de sacarose. **Acta Amazonica**, v. 43 p.127– 134, 2013.

GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.

GUPTA, A. Studies on *Malaxis acuminata* D. don (= *Microstylis wallichii* Lindl.) a medicinally important orchid. **Journal of Global Research Computer Science and Technology**, v. 4, p. 1-11, 2016.

HAN, X.; ZENG, H.; BARTOCCI, P.; FANTOZZI, F.; YAN, Y. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review. **Fermentation**, v. 4, p. 1-15, 2018.

ISLAM, T.; BHATTACHARJEE, B.; ISLAM, S.M.S.; UDDAIN, J.; SUBRAMANIAM, S. Axenic seed culture and *in vitro* mass propagation of Malsyan wild orchid *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. **Pakistan Journal of Botany**, v.47, p.2361-2367, 2015.

JING, G. F.; AB RAZAK, W. N. A. W.; RAHMAN, Z. A.; SUBRAMANIAM, S. The effect of thin cell layer system in *Vanilla planifolia* *in vitro* culture. **Current Botany**, v. 5, p. 22-25, 2014.

JORGE, J.; JURAS, M. C. R.; SUZUKI, R. M. Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 3, p. 134-141, 2015.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KOENE, F. M.; AMANO É.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 121 p. 83-91, 2019.

KUMAR, G.; SOHOO, D. Effect of seaweed liquid extract on growth and yield of *Triticum aestivum* var. Pusa Gold. **Journal Applied Phycology**, v. 23 p. 251–255, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAVARRO-LÓPEZ, E.; RUÍZ-NIETO, A.; FERREIRA, A.; ACIÉN F. G.; GOUVEIA, L. Biostimulant potential of *Scenedesmus obliquus* grown in Brewery Wastewater. **Molecules**, v. 25 p. 3-16, 2020.

ODGEREL, B.; TSERENDULAM, D. Effect of chlorella as a biofertilizer on germination of wheat and barley grains. **Proceedings of the Mongolian Academy of Sciences**, v. 56, n. 4. p. 26-31, 2016.

PALAORO, G. J.; SCHMILDT, O.; FERREIRA, J. P.; FIGUEIREDO, D. D. C.; SCHMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S. Crescimento *in vitro* de *Cattleya bowringiana* O'brien (Orchidaceae) em diferentes níveis de macronutrientes e sacarose. **Revista Nucleus**, v. 15, n.1. p. 31-40, 2018.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155–163, 1998.

PEREIRA, N. S.; FERREIRA, B. R. R.; MACHADO DE CARVALHO, E.; DAMIANI, C. R. Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2347–2358, 2018.

PHILLIPS, G.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 242-257, 2019.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

RODRIGUES, D. B.; NADAL, M. C.; CAMARGO, S. S.; DE ASSIS, A. M.; SCHUCH, M. W.; PEIL, R. M. N.; FARIA, R. T. Growth regulators and substrates for *Oncidium baueri* Lindl. micropropagation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 2901-2910, 2016.

RONGA, D.; BIAZZI, E.; PARATI, K.; CARMINATI, D.; CARMINATI, E.; TAVA, A. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, v. 9, p. 6-22, 2019.

SAIPRASAD, G. V. S.; RAGHUVeer, P., KHETARPAL S.; CHANDRA R. Effect of various polyamines on production of protocorm-like bodies in orchid—*Dendrobium* 'Sonia'. **Scientia Horticulturae**, v. 100, p. 161–168, 2004.

SCHNEIDER, L.; PAULA ARAÚJO, J. S.; ZAFFARI, G. R. Seed germination of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri* in alternative culture media. **American International Journal of Contemporary Research**, v. 4, n. 7; p. 60-66, 2014.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya spp.*, Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, p. 185-191, 2012.

SIPAYUNG, P.; MATANARI, J.; LAFAU, M. B.; SULASTRI, Y. S.; GINTING, B. B.; SIHOMBING, D. R.; PANDIANGAN, M.; GIAWA, T. The effect of activated charcoal dose and benzyl amino purine concentration on the growth of orchid plantlets in murashige and skoog media *in vitro*. **International Conference on Agribusiness, Food and Agro-Technology**, v. 205, p. 1-8, 2018.

STIRK, W. A.; ÖRDÖG V.; NOVÁK, O.; ROLCIK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT P.; VAN STADEN, J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v. 49, p 459–467, 2013.

TAMBARUSSI, E. V.; VEASEY, E. A.; MENEZES, L.; IBAÑES, B.; LOMBARDI, K. C.; VENCOSKY, R. Genetic diversity between native and improved *Cattleya walkeriana* Gardner famous clones. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 39, n. 3, p. 315-320, 2017.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The role of thin cell layers in regeneration and transformation in orchids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 113, n. 2, p. 149-161, 2013.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Dissecting the concept of the thin cell layer: theoretical basis and practical application of the plant growth correction factor to apple, *Cymbidium* and *Chrysanthemum*. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 881- 895, 2014.

TEIXEIRA DA SILVA J. A.; ALTAMURA M. M.; DOBRÁNSZKI J. The untapped potential of plant thin cell layers. **The Horticulture Journal**, v. 23, p. 127–131, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA J. A.; KERBAUY G. B.; ZENG S-J.; CHEN Z.; L.; DUAN J. *In vitro* flowering of orchids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 56–76, 2014.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Recent advances and novelties in the thin cell layer-based plant biotechnology – a mini-review, **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 100. p 89–96, 2019.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA. M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN Z. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, p. 110-124, 2017.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618–631, 2008.

VIRÁG, E.; MOLNÁR, Z.; ÖRDOG, V. Application of algal biomass for enhanced acclimatization of orchids. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55, p. 179-181, 2011.

VUDALA, S. M.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **South Africa Journal of Botany**, v. 121 p.76-82, 2019.

VUDALA, S. M.; RIBAS L.L.F.; Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 108 p. 1–7, 2017.

WATTANAPAN, N.; NUALSRI, C.; MEESAWAT, U. *In vitro* propagation through transverse thin cell layer (tTCL) culture system of lady's slipper orchid: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 40, p. 306-313, 2018.

YASIN, Z.; MAHMOOD, M.; SHAHARUDDIN, N. A. Effects of benzyladenine purine and its interaction with polyamines on growth of *Spathoglottis plicata* PLBs. **Turkish Journal of Botany**, v. 39. p. 245-252, 2015.

YEUNG, E. C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, v. 58, p.1-14, 2017.

ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T.; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Substratos alternativos ao esfagno na aclimatização de plântulas de *Arundina graminifolia* “alba” (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n.1, p. 7-12, 2014.

CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* UTILIZANDO BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* (SCENEDESMACEAE).

RESUMO

Cattleya warneri é uma orquídea com um alto potencial ornamental, pela beleza de suas flores, sendo muito coletada no seu habitat natural e atualmente foi considerada vulnerável, necessitando de estudos de conservação e propagação. As suas sementes dificilmente germinam na natureza, pois não possuem reservas e dependem de associação com fungos micorrízicos para germinar. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de biomassa e extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus* na germinação assimbiótica e no desenvolvimento de plântulas de *Cattleya warneri*. As sementes foram germinadas em meio de cultura MS, com os macronutrientes reduzidos pela metade (MSM/2), suplementado com: 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de biomassa ou extrato. Os estádios de desenvolvimento dos protocormos foram avaliados até a formação das plântulas (4 a 24 semanas). Protocormos clorofilados foram observados com quatro semanas e a adição de biomassa ou extrato (0,25 g L⁻¹) acelerou a germinação. Após 24 semanas da semeadura, foram observadas porcentagens elevadas de plântulas (acima de 95%) em todos os tratamentos com biomassa e com adição de 0,25 e 0,5 g L⁻¹ de extrato. As concentrações de 1 ou 2 g L⁻¹ de extrato inibiram a germinação e o desenvolvimento das plântulas. O alongamento da parte aérea e o desenvolvimento de raízes foram recomendados em meio semi-sólido, suplementado com 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado. Os explantes cultivados em meio dupla-fase (camada de meio líquido, contendo 0,5 a 2 g L⁻¹ de extrato, sobre o meio semi-sólido) formaram novos brotos e plantas pela presença de zeatina na composição do extrato. As plântulas foram aclimatizadas com sucesso, apresentando elevadas porcentagens de sobrevivência (acima de 80%), após pulverizações foliares com 2,0 g L⁻¹ de biomassa ou 1,0 g L⁻¹ de extrato por quatro meses. Em conclusão, a adição do extrato ou biomassa de *D. subspicatus* ao meio MSM/2 acelerou a germinação, induziu a formação de brotos, produzindo plantas bem desenvolvidas na aclimatização. Foi obtido um protocolo completo e eficiente de germinação e desenvolvimento de plântulas de *C. warneri* utilizando biomassa e extrato de *D. subspicatus*.

Palavras-chave: Bioestimulante. Cultivo *in vitro*. Orchidaceae. Protocormos.

CHAPTER I

ASYMBYOTIC SEED GERMINATION AND SEEDLING DEVELOPMENT OF *Cattleya warneri* USING *Desmodesmus subspicatus* (SCENEDESMACEAE) MICROALGA BIOMASS AND EXTRACT.

ABSTRACT

Cattleya warneri is an orchid with high ornamental potential, due to the beauty of its flowers, being widely collected in its natural habitat and was currently considered vulnerable, requiring conservation and propagation studies. Seed germination in nature is difficult, as they have no reserves and depend on association with mycorrhizal fungi to germinate. This study evaluated the effect of the addition of biomass and aqueous extract of *Desmodesmus subspicatus* microalga on asymbiotic germination and seedling development *Cattleya warneri* orchid. Seeds were germinated in MS culture medium, with the macronutrients reduced by half (MSM/2), supplemented with 0, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 g L⁻¹ of microalga biomass or its aqueous extract. The developmental stages of the protocorms were evaluated until seedling formation (4 to 24 weeks). Chlorophyllous protocorms were observed after four weeks and the addition of biomass or extract (0.25 g L⁻¹) accelerated germination. Twenty-four weeks after sowing, high percentages of seedlings (greater than 95%) were observed in all treatments with biomass, as well as with the addition of 0.25 or 0.5 g L⁻¹ of microalgal extract. Concentrations of 1 or 2 g L⁻¹ of extract inhibited germination and seedling development. Shoot elongation and root development were increased in the semi-solid medium supplemented with 2.0 g L⁻¹ of activated charcoal. Plantlets cultivated in a double-phase medium (a thin layer of liquid medium, containing 0.5 to 2 g L⁻¹ of extract, on the semi-solid medium) demonstrated the positive effect of zeatin on the formation of new shoots and plants. The seedlings were successfully acclimatized, showing high percentages of survival (above 80%) and foliar spraying with 2.0 g L⁻¹ of biomass or 1.0 g L⁻¹ of extract for four months was recommended. The addition of *D. subspicatus* biomass or extract accelerated the germination, induced shoot formation, and produced well-developed seedlings during acclimatization. A complete and efficient protocol of germination and seedling development of *C. warneri* was achieved using biomass and aqueous extract of *D. subspicatus*.

Keywords: Biostimulant. Protocorms. *In vitro* cultivation. Orchidaceae.

1 INTRODUÇÃO

C. warneri T. Moore (Orchidaceae) é uma espécie epífita que apresenta as maiores flores do gênero, com um alto potencial ornamental e com um elevado valor de mercado. Com isso, há muitos anos essa espécie tem sofrido um elevado extrativismo na natureza e destruição de seu habitat. Estima-se que sem adequada fiscalização e ações de conservação, ela poderá sofrer uma redução populacional de 30% nos próximos 30 anos. Levando em conta sua distribuição restrita e seu habitat fragmentado, a espécie encontra-se como "Vulnerável" (CNCFlora, 2012), sendo necessários estudos visando o aprimoramento das técnicas de propagação para auxiliar estratégias para sua conservação.

A propagação das orquídeas na natureza apresenta baixa eficiência, apesar de suas sementes serem numerosas, são muito pequenas, com reserva nutricional ausente e na maioria das vezes necessitam de associações micorrízicas e condições ambientais favoráveis para que possam germinar (YEUNG *et al.*, 2018). Sendo assim, a germinação assimbiótica ou *in vitro* é uma alternativa com alto potencial para a produção de mudas de orquídeas. Para a germinação assimbiótica ser eficiente, muitos estudos vêm sendo realizados para definir a formulação de meio de cultura mais adequada que varia conforme a espécie. O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suas variações, com concentração de sais reduzida pela metade (MS/2) ou de macronutrientes reduzidos pela metade (MSM/2) foi recomendado para orquídeas do gênero *Cattleya*, como: *Cattleya intermedia* e *Cattleya warneri* (SCHNEIDER *et al.*, 2014) *Cattleya forbesii* x *Cattleya bowringiana* (COLOMBO *et al.*, 2017).

Na germinação assimbiótica de orquídeas, podem ser adicionados reguladores de crescimento vegetais e para algumas espécies, recomenda-se a adição de carvão ativado ou de suplementos de composição indefinida como polpa de banana e água de coco (SCHNEIDER *et al.*, 2014; COLOMBO *et al.*, 2017). Nos últimos anos vêm sendo estudados suplementos alternativos para os meios de cultura, como as microalgas, que podem reduzir o custo e promover o crescimento e desenvolvimento das plantas (PEREIRA *et al.*, 2018; CORBELLINI *et al.*, 2020). As microalgas são capazes de crescer rapidamente e sua alta eficiência na fotossíntese, combinada com a capacidade de acumular uma grande quantidade de bioprodutos dentro de suas células, as tornam adequadas para servir como matéria-

prima industrial (RIZWAN *et al.*, 2018). Além disso, as microalgas contêm altos níveis de macronutrientes e micronutrientes, essenciais para o crescimento e desenvolvimento das culturas e servem como bioestimulantes ou biofertilizantes. Atualmente, o uso de microalgas em produções agrícolas está atraindo o interesse de produtores e indústrias agroquímicas com o objetivo de melhorar a sustentabilidade da produção agrícola (RONGA *et al.*, 2019).

As microalgas do gênero *Desmodesmus* são microrganismos clorofilados, de estrutura unicelular, pertencentes à família *Scenedesmaceae*, comumente encontradas em água doce e com menor frequência em água salgada. Apresentam células isoladas ou crescimento colonial, geralmente com quatro células dispostas paralelamente ao eixo longitudinal e com espinhos alongados em suas extremidades (CANCELA *et al.*, 2017). Alguns pesquisadores consideravam os dois gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus* como sinônimos, porém análises filogenéticas confirmaram a recente divisão do antigo gênero *Scenedesmus* nos novos gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus* (HANNEN *et al.*, 2002). Em cepas de microalgas de *Desmodesmus armatus*, foram identificados componentes pertencentes às classes hormonais essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, como as auxinas e citocininas (STIRK *et al.*, 2013).

Estudos com o uso de microalgas no cultivo *in vitro* são escassos, porém apresentaram resultados promissores. VIRÁG *et al.* (2011) observaram que a adição de 0,5 g L⁻¹ da biomassa de *Scenedesmus* sp. e de *Nostoc* aumentou a área foliar e a massa fresca das plântulas de *Paphiopedilum* sp. Corrêa (2019) ao avaliar o efeito do extrato da mesma microalga no meio MSM/2, constatou que a adição de 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de extrato proporcionou maior desenvolvimento dos protocormos de *C. warneri*.

Após o crescimento das plântulas *in vitro* estas precisam ser transplantadas e aclimatizadas em casa de vegetação. Para obtenção de elevada porcentagem de sobrevivência das plantas de orquídeas, é necessária a utilização de substratos adequados, como por exemplo, para orquídeas do gênero *Cattleya*, fibra de coco, casca de pinus e esfagno (LONE *et al.*, 2008; COLOMBO *et al.*, 2017). Pulverizações com microalgas após o transplante de mudas também têm sido eficientes para melhorar o desenvolvimento de plantas durante a aclimatização, como foi constatado para *Phalaenopsis* e *Oncidium* (VIRÁG *et al.*, 2011). Ainda não existem relatos da adição de biomassa ou extrato da microalga *D. subspicatus* na germinação *in vitro* e na produção de mudas de orquídeas. Com isso, o objetivo

desse estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de biomassa e de extrato da microalga *D. subspicatus* no meio de cultura MSM/2 na germinação assimbiótica, no alongamento e desenvolvimento de raízes e na aclimatização para acelerar a produção de mudas em grande escala de *C. warneri*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos de micropropagação foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O cultivo da microalga *D. subspicatus*, o preparo do extrato e da biomassa, a caracterização dos extratos e a quantificação dos reguladores vegetais foram realizados no Laboratório de Aplicações Biotecnológicas de MicroAlgas (LABMA), do Departamento de Bioquímica da UFPR.

2.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO AQUOSA

D. subspicatus foi obtida da coleção de microalgas Elizabeth Aidar da Universidade Federal Fluminense. As microalgas foram cultivadas em um fotobiorreator de placa plana com volume útil de 100 L durante 14 dias em sala climatizada (23 ± 1 °C), em regime fotoautotrófico com iluminação contínua e intensidade luminosa de $155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ usando meio de cultivo BBM (NICHOLS e BOLD, 1965). Foram determinados parâmetros de crescimento como a biomassa seca (APHA, 2005), densidade celular por microscopia óptica e variações do pH. A biomassa produzida foi recuperada por floculação utilizando quitosana como agente floculante, seguindo metodologia descrita por Corrêa *et al.* (2018) que permite concentrar a biomassa em até 5% do volume de cultivo original. Após a floculação, o concentrado foi separado do meio de cultivo residual por centrifugação a 2600 g por 20 min a 4 °C, seguido de congelamento e liofilização.

A biomassa seca foi submetida à extração aquosa em água ultrapura a 10% (m/v), em agitação à temperatura ambiente por 1 h. Após a extração, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante (extrato aquoso) foi reservado e o precipitado

(biomassa residual) suspenso novamente em igual volume de água para repetição do procedimento, a fim de maximizar a eficiência de extração. Após a segunda etapa de extração os dois volumes de extrato aquoso foram reunidos e secos por liofilização, com a finalidade de determinar o rendimento do processo e evitar a degradação de moléculas termolábeis. Os extratos obtidos por esse processo foram utilizados para determinação de sua composição bioquímica e avaliação da atividade bioestimulante em bioensaios com *C. warneri*.

2.2.1 Composição da biomassa seca e extrato aquoso da microalga

A biomassa liofilizada (20 mg) foi submetida à hidrólise ácida com 1 mL de H₂SO₄ (80%, v/v) a temperatura ambiente por 20 h, seguido de adição de 9 mL de água e centrifugação para 8500 g por 5 min. O sobrenadante (1 mL) foi utilizado para determinação dos carboidratos totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As proteínas foram determinadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), com hidrólise alcalina prévia da biomassa liofilizada utilizando NaOH 1 M, de acordo com metodologia descrita por Ma *et al.* (2016). Lipídeos totais foram extraídos usando uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), seguindo metodologia gravimétrica descrita por Bligh e Dyer (1959).

Os fitormônios presentes no extrato aquoso (1 mg mL⁻¹ em acetonitrila) foram determinados por HPLC-MS, usando padrões analíticos de auxinas (ácido 3-indol-acético - AIA), citocininas (N6-benziladenina - BA; N6-benziladenosina - BAR; di-hidrozeatina - DZ; N6-isopenteniladenina - iP; cinetina - K; cinetina ribosídeo - KR; trans-zeatina - Z; trans-zeatina ribosídeo - ZR), giberelina (ácido giberélico - GA₃) e do ácido abscísico (ABA) (OChemIm Ltd, Olomouc, Czech Republic) para referência e comparação dos tempos de retenção. Ácido fórmico (85%, v/v), acetonitrila (99,9%, v/v) e água ultrapura foram utilizados para compor a fase móvel, que consistia de dois solventes: (A) acetonitrila e ácido fórmico (0,1%, v/v); (B) água ultrapura e ácido fórmico (0,01%, v/v). A análise foi realizada em um HPLC Shimadzu LC10-A (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com coluna cromatográfica Ascentis® C18 (15 cm x 2,1 mm, 3 µm), acoplado a espectrômetro de massas Bruker MicrOTOF-Q II XL (Bruker, Billerica, USA), com fonte de ionização por eletrodispersão (eletrospray – 100 eV) e gás nebulizador nitrogênio (4 Bar, 200 °C), utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: volume de injeção (10 µL); fluxo

(0,4 L min⁻¹); temperatura (40 °C) e fase móvel com gradiente de solventes A e B (0 min – 3%:97%; 8 min – 30%:70%; 10 min – 50%:50%; 14 min – 80%:20%; 20 min).

2.3 MATERIAL VEGETAL

Sementes de quatro cápsulas, obtidas de polinização cruzada de indivíduos diferentes de *C. warneri* (FIGURA 1A) foram coletadas no Instituto de Botânica de São Paulo e armazenadas em refrigerador (4 °C) por 14 meses.

2.3.1 TESTE DO TETRAZÓLIO (TZ)

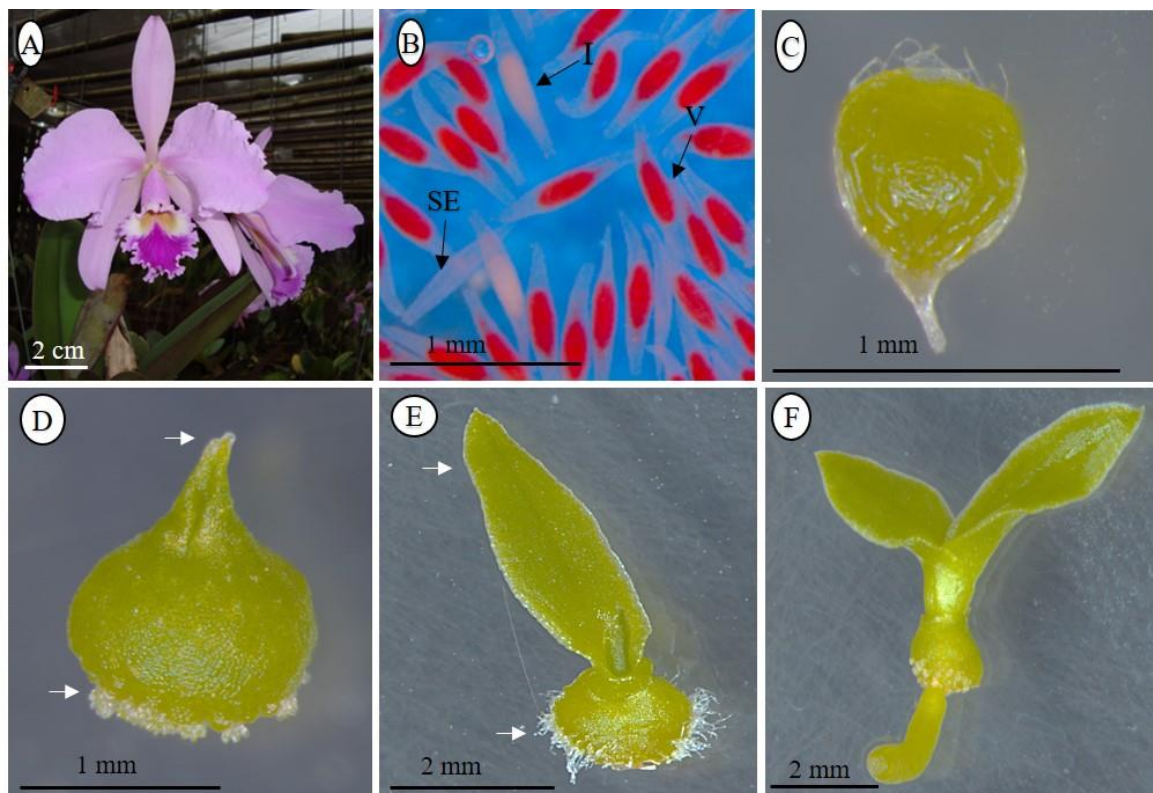
O teste de viabilidade das sementes foi realizado com três amostras de sementes (5 mg), as quais foram pré-condicionadas em solução de sacarose a 10% por 24 horas. Após este período, as sementes foram transferidas para a solução neutra de tetrazólio 1%, mantidas por 24 horas em banho-maria à temperatura constante de 38 °C e na ausência de luz. Em seguida, alíquotas de cada amostra foram colocadas em lâminas de vidro com fundo azul e avaliadas em microscópio estereoscópico (modelo SMZ-171, Motic). Foram realizadas contagens para verificar a porcentagem de sementes viáveis (embrião com coloração vermelha), inviáveis (embrião com coloração branca) e palha (sem embrião) (FIGURA 1B), conforme a metodologia descrita por HOSOMI *et al.* (2011). As sementes foram fotografadas em microscópio estereoscópico Leica MZ16 (câmera Leica DFC500). Após a avaliação da viabilidade, as sementes utilizadas no teste do tetrazólio foram descartadas.

2.3.2 GERMINAÇÃO IN VITRO

Foram pesadas 55 mg de sementes de quatro cápsulas e desinfestadas em câmara de fluxo laminar com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% (v/v), acrescida de 0,1% de Tween 20®, durante 10 minutos e em agitação. Em seguida, as sementes com a solução desinfestante, foram transferidas para um funil de vidro revestido com papel filtro esterilizado, onde foram realizadas seis lavagens com água destilada esterilizada. Após a secagem das sementes no papel filtro, com auxílio de uma espátula foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura MS, com a concentração de macronutrientes pela metade (MSM/2) e

suplementado com 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de biomassa ou extrato de *D. subspicatus*. Foram utilizadas cinco placas de Petri por tratamento com aproximadamente 400 sementes cada. Em cada placa foram demarcadas três regiões contendo 100 sementes, para o acompanhamento dos seguintes estádios: protocormo clorofilado (= germinação) (FIGURA 1C), protocormos com ápice e/ou rizóides (FIGURA 1D), protocormo com uma ou duas folhas (FIGURA 1E) e plântula (FIGURA 1F). As avaliações foram realizadas após quatro, oito, doze, dezesseis, vinte e vinte quatro semanas de cultivo.

FIGURA 1 – *Cattleya warneri* **A:** PLANTA MADURA CONTENDO FLORES; **B:** AVALIAÇÃO DO TESTE DO TETRAZÓLIO V= SEMENTE COM EMBRIÃO VIÁVEL, I= INVIÁVEL, SE= SEM EMBRIÃO; **C:** SEMENTE COM TESTA ROMPIDA/PROTOCORMO CLOROFILADO (=GERMINADA); **D:** PROTOCORMO COM ÁPICE E RIZÓIDES (SETA); **E:** PROTOCORMO UMA FOLHA E RIZÓIDES (SETA). **F:** PROTOCORMO COM DUAS FOLHAS E RADÍCULA (PLÂNTULA).



FONTE: A autora (2020).

2.4 ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES

Plântulas com aproximadamente 0,5 cm de altura, obtidas da germinação *in vitro*, tiveram as suas radículas cortadas e foram inoculadas em frascos contendo o meio MSM/2, acrescido das mesmas concentrações de extrato ou de biomassa

utilizadas na germinação. Foram utilizados 10 frascos por tratamento com oito explantes por frasco, totalizando 80 explantes por tratamento. Após 90 dias, foi feita uma avaliação e um subcultivo para os meios, contendo os mesmos tratamentos.

Após avaliação realizada aos 90 dias, foi realizado um segundo subcultivo, no qual os explantes foram inoculados em meio de cultura MSM/2, semi-sólido, com 2 g L^{-1} de carvão ativado (40 ml) ou dupla-fase (sobre esse meio semi-sólido foi adicionado 10 ml de meio líquido, com as mesmas concentrações de biomassa e extrato: 0, 0,25; 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ g L}^{-1}$). Foram utilizados cinco frascos com oito explantes por frasco e cinco repetições por tratamento.

As variáveis avaliadas nessa etapa foram: porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio da maior raiz (cm), comprimento médio da parte aérea (cm), massa fresca (g), porcentagem de brotações e número médio de brotos.

2.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS

As plantas medindo aproximadamente 1,5 cm de comprimento, com duas folhas foram retiradas dos frascos, as suas raízes lavadas e plantadas em bandejas de semeadura contendo 180 células (52 cm x 26 cm) e cada célula com $4,5 \text{ cm}^2$, contendo esfagno como substrato (0,5 g por célula). Foram realizadas pulverizações com água para plantas vindas do meio semi-sólido (controle) e um tratamento com fertilizante foliar Forth® para manutenção das orquídeas (5 ml L^{-1}) para plantas vindas do meio dupla-fase (controle) e também com as mesmas concentrações de biomassa ou extrato de microalgas.

As pulverizações (30 ml por tratamento ou 0,75 ml por planta) foram feitas a cada sete dias no primeiro mês e depois quinzenalmente, por um período de 120 dias. Cada tratamento foi constituído de oito plantas (uma por célula) e cinco repetições, totalizando 40 plantas por tratamento. Após quatro meses de permanência na casa de vegetação foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, comprimento médio da parte aérea (cm), número médio de folhas, massa fresca (g), número médio de raízes, comprimento médio da maior raiz (cm) e porcentagem de mortalidade de raízes.

2.6 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado nas etapas *in vitro* foi o MSM/2, suplementado com 5,6 g L⁻¹ de ágar Vetec® e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1N, antes da adição do ágar. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave à 121°C durante 20 minutos. Para a germinação *in vitro* foram colocados 40 ml de meio de cultura em cada placa de Petri (100 x 150 mm). Para a etapa de alongamento e desenvolvimento de raízes, os explantes foram colocados em frascos de vidro de capacidade de 100 ml (65 x 80 mm) contendo 40 ml de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 22 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 73 µmol m⁻² s⁻¹ (germinação *in vitro*) e 40 µmol m⁻² s⁻¹ (alongamento e desenvolvimento de raízes).

As mudas transplantadas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura média de 19 ± 2° C, mínima de 14 ± 2° C e máxima de 22 ± 2° C, fotoperíodo de 12 horas e com iluminação artificial de 80 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas de vapor de mercúrio.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Para atender as condicionantes da análise de variância (ANOVA), a variável porcentagem de germinação foi transformada para X². Foi aplicada a análise de variância, em um modelo fatorial, em esquema de parcelas subdivididas. O fator atribuído as parcelas foram concentrações (de biomassa e extrato de microalga) e os períodos de avaliação (4, 8, 12, 16, 20 e 24 semanas) para as subparcelas. A independência do período de avaliação foi garantida, dado que nos diferentes períodos não foram as mesmas sementes avaliadas. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 1% de significância. O teste de Tukey foi representado com plotagem das médias e do intervalo de confiança do teste de médias. Análise de regressão não foi aplicada para avaliar os tratamentos, porque o objetivo foi comparar apenas pontualmente as concentrações testadas e os períodos avaliados. As análises foram realizadas utilizando-se a linguagem de programação Julia, na qual as funções para a análise dos dados e representação gráfica foi desenvolvida por Alexandre Behling.

Esse mesmo procedimento foi repetido para experimentos de biomassa e extrato. A avaliação dos fatores na interação foi realizada utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Para avaliação da porcentagem dos estádios dos protocormos clorofilados (germinação) e de plântulas foi aplicado o teste de Qui-quadrado para comparar as frequências. A análise dos períodos de avaliação na germinação assimbiótica foi realizada utilizando ANOVA e análise de regressão. A escolha do grau do polinômio (simples ou múltiplo) foi feita de acordo com a significância da equação.

Para as etapas de alongamento e desenvolvimento de raízes e de aclimatização de plantas, os dados foram submetidos à análise de regressão.

3 RESULTADOS

3.1 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA

A caracterização da composição bioquímica da biomassa e do extrato da microalga *D. subspicatus* indicou a presença de zeatina, carboidratos, proteínas e cinzas. As concentrações dos componentes apresentaram variações, com maiores valores na biomassa seca, com exceção dos lipídios que só foram identificados na biomassa seca (TABELA 1). O único hormônio detectado na análise foi a citocinina do tipo trans-zeatina - Z, sendo que os demais hormônios analisados auxinas, giberelina e ácido abscísico encontravam-se ausentes ou abaixo do limite de detecção. (TABELA 1).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA E EXTRATO AQUOSO DE *Desmodesmus subspicatus*.

Composição*	Biomassa seca	Extrato aquoso
Carboidratos (mg g ⁻¹)	312,4 ± 6,8	227,1 ± 4,3
Proteínas (mg g ⁻¹)	213,6 ± 3,5	164,5 ± 3,8
Lipídeos (mg g ⁻¹)	142,1 ± 5,2	Nd
Cinzas (mg g ⁻¹)	209,8 ± 4,1	217,5 ± 6,2
Zeatina (µg g ⁻¹)	7,2 ± 0,8	45,8 ± 1,8

FONTE: a autora (2020).

3.2 TESTE DE VIABILIDADE DO TETRAZÓLIO

O resultado do teste TZ indicou 87,5% de sementes viáveis, 8,5% de sementes inviáveis e 4,0% sem embrião (FIGURA 1B), com o coeficiente de variação de 11,1%.

3.3 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

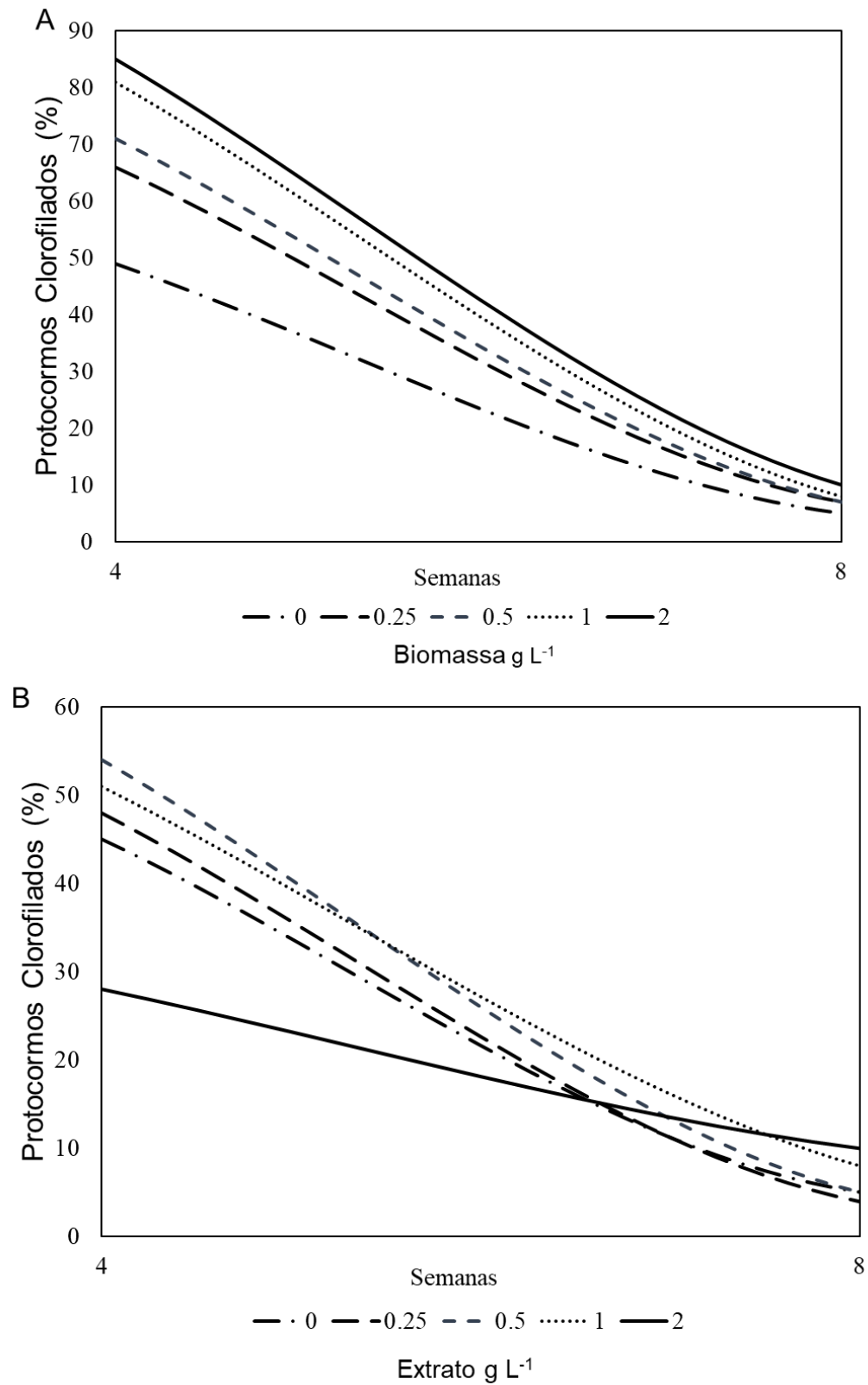
A germinação assimbiótica de *C. warneri*, como também das orquídeas em geral, inicia com embriões clorofilados, seguida da ruptura da testa da semente e o estágio de protocormo clorofilado que indica germinação (FIGURA 1C).

Os protocormos clorofilados foram observados com quatro semanas e as maiores porcentagens foram obtidas em meios de cultura suplementados com biomassa, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos (Teste X^2 , $P \leq 0,05$). À medida que aumentou a concentração de biomassa, aumentou a porcentagem de protocormos clorofilados, com melhor resposta para o tratamento com adição de 2 g L⁻¹ (85,3%) e a pior ocorreu no meio sem adição de biomassa (49,1%) (Teste X^2 , $P \leq 0,05$, FIGURA 2A).

A germinação no meio contendo extrato também ocorreu com maior frequência com quatro semanas, com as maiores porcentagens de protocormos clorofilados obtidos com adição de 0,5 g L⁻¹ (53,7%), 1,0 g L⁻¹ (50,9%), e 0,25 g L⁻¹ de extrato (47,9%), com diferenças significativas entre os tratamentos (Teste X^2 , $P < 0,05$, FIGURA 2B). No meio sem adição de extrato foram formados 44,9% de protocormos, enquanto com adição de 2 g L⁻¹ no meio de cultura, a germinação foi inibida, com apenas 27,9% de protocormos formados (Teste X^2 , $P \leq 0,05$, FIGURA 2B).

A comparação das figuras 2A e 2B indicou que a adição de biomassa foi mais eficiente do que a do extrato na germinação inicial de sementes de *C. warneri*.

FIGURA 2 – PORCENTAGEM DE PROTOCORMOS CLOROFILADOS (= GERMINAÇÃO) DE *Cattleya warneri*, OBTIDOS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADOS COM: **A-** BIOMASSA E **B-** EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*, APÓS 4 E 8 SEMANAS.



FONTE: A autora (2020).

Os outros estádios dos protocormos com ápice e/ou rizóides (FIGURA 1D), com uma folha e/ou rizóides (FIGURA 1E), com duas ou mais folhas e com raiz = plântula (FIGURA 1F) foram observados no período de 4 a 24 semanas, dependendo da adição e concentração da biomassa ou extrato.

3.3.1 Efeito da biomassa de *D. subspicatus* na germinação de *C. warneri*, após diferentes períodos de semeadura

O teste F da análise de variância indicou que a interação concentração de biomassa e períodos de semeadura foi significativa (ANEXO 1, $P \leq 0,001$).

Após quatro semanas da semeadura, as porcentagens de germinação das sementes cultivadas em meios MSM/2, contendo as concentrações mais elevadas de biomassa (0,5, 1,0 e 2,0 g L⁻¹) foram significativamente superiores às obtidas com a menor concentração de 0,25 g L⁻¹ e sem adição de biomassa (Teste de Tukey, $P \leq 0,001$, TABELA 2). Na avaliação seguinte (oito semanas) observou-se um aumento das porcentagens totais obtidas, com melhores respostas nos meios suplementados com as concentrações mais elevadas (1 e 2 g L⁻¹), sendo superiores à do meio contendo 0,25 g L⁻¹ e sem biomassa (Teste de Tukey, $P \leq 0,001$, TABELA 2). Após 12 e 16 semanas, todos os tratamentos com biomassa apresentaram porcentagens superiores de germinação quando comparadas com à do meio sem adição de biomassa. (Teste de Tukey, $P \leq 0,001$, TABELA 2). Nas avaliações finais (20 e 24 semanas da semeadura), constatou-se elevadas porcentagens de sementes germinadas (superior a 97,1%) em todos os tratamentos, inclusive no sem adição de biomassa (Teste de Tukey, $P > 0,001$, TABELA 2).

Em relação aos períodos de avaliação, constatou-se que para os períodos de 12 semanas a 24 semanas não ocorreu diferenças significativas das porcentagens totais de germinação em meios sem ou com adição de biomassa (Teste de Tukey, $P \leq 0,001$, TABELA 2). Sendo assim, esses resultados indicaram que o período de 12 semanas é suficiente para realizar a avaliação da germinação de sementes.

A análise conjunta da concentração de biomassa e período de avaliação indicou que para acelerar a germinação de sementes de *C. warneri* recomenda-se adicionar 0,25 g L⁻¹ de biomassa no meio MSM/2, pois com 12 semanas 99,1% das sementes já tinham germinado (TABELA 2).

TABELA 2 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Catleya warneri*, CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* E PERÍODOS DE SEMEADURA.

Tratamentos Biomassa (B) g L ⁻¹	Germinação total (%) (semanas)					
	4	8	12	16	20	24
Controle	76,9 c C	82,9 c B	93,9 b A	95,4 b A	97,1 a A	99,5 a A
B 0,25	83,8 b C	87,8 b B	99,1 a A	99,5 a A	100,0 a A	100,0 a A
B 0,5	87,5 a B	89,1 a b B	97,3 a A	99,3 a A	99,8 a A	100,0 a A
B 1,0	87,7 a C	92,1 a B	98,6 a A	99,3 a A	100,0 a A	100,0 a A
B 2,0	88,2 a C	91,6 a B	100,0 a A	100,0 a A	100,0 a A	100,0 a A

Letras minúsculas diferentes nas colunas e letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey P <0,001.

FONTE: A Autora (2020).

3.3.2 Efeito do extrato de *D. subspicatus* na germinação *in vitro* de *C. warneri*, após diferentes períodos de semeadura

O teste F na análise de variância indicou que a interação das concentrações de extrato e períodos de semeadura foi significativa (ANEXO 1, P ≤ 0,001).

Após quatro semanas de cultivo foram observadas maiores porcentagens de germinação no meio MSM/2, suplementado com 0,25 g L⁻¹ de extrato, quando comparada com as obtidas nos outros tratamentos (Teste de Tukey, P ≤ 0,001, TABELA 3). Nos períodos de oito e doze semanas, as maiores porcentagens de germinação ocorreram nos meios contendo 0,25 e 0,5 g L⁻¹. No entanto, após 16, 20 e 24 semanas, as porcentagens de germinação dos meios sem adição de extrato e com 0,25 e 0,5 g L⁻¹ de extrato foram significativamente superiores (99,4% a 100,0%) às dos meios com as concentrações mais elevadas (1,0 e 2,0 g L⁻¹) (Teste de Tukey, P ≤ 0,001, TABELA 3). A inibição da germinação de sementes nos meios contendo 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de extrato da microalga foi constatada após quatro semanas até 24 semanas da semeadura, sendo obtidas menores porcentagens com 2,0 g L⁻¹ (TABELA 3).

Os resultados dos períodos de avaliação indicaram que com adição de 0,25 e 0,5 g L⁻¹ de extrato no meio de cultura não houve diferença da germinação total entre 12 a 24 semanas. No entanto, para os meios sem adição de extrato isso ocorreu no período de 16 a 24 semanas (TABELA 3, Teste de Tukey, P >0,001).

A análise conjunta da concentração de extrato e período de avaliação indicou que para acelerar a germinação de sementes de *C. warneri* recomenda-se

adicionar 0,25 g L⁻¹ de extrato no meio MSM/2, pois com 12 semanas 98,5% das sementes já tinham germinado (TABELA 3).

TABELA - 3 PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Catleya warneri*, CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* E PERIODOS DE SEMEADURA.

Tratamentos	Germinação total (%)					
	semanas					
Extrato (E) (g L ⁻¹)	4	8	12	16	20	24
Controle	80,1 c D	85,9 b C	93,6 b B	99,4 a A	100,0 a A	100,0 a A
E 0,25	91,8 a B	93,5 a B	98,5 a A	100,0 a A	100,0 a A	100,0 a A
E 0,5	87,3 b C	92,8 a B	99,5 a A	100,0 a A	100,0 a A	100,0 a A
E 1,0	74,9 d B	80,8 c A	83,5 c A	85,5 b A	87,9 b A	89,3 b A
E 2,0	42,1 e D	46,3 d D	51,7 d C	58,7 c C	66,0 c B	73,6 c A

Letras minúsculas diferentes nas colunas e letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey P ≤ 0,001.

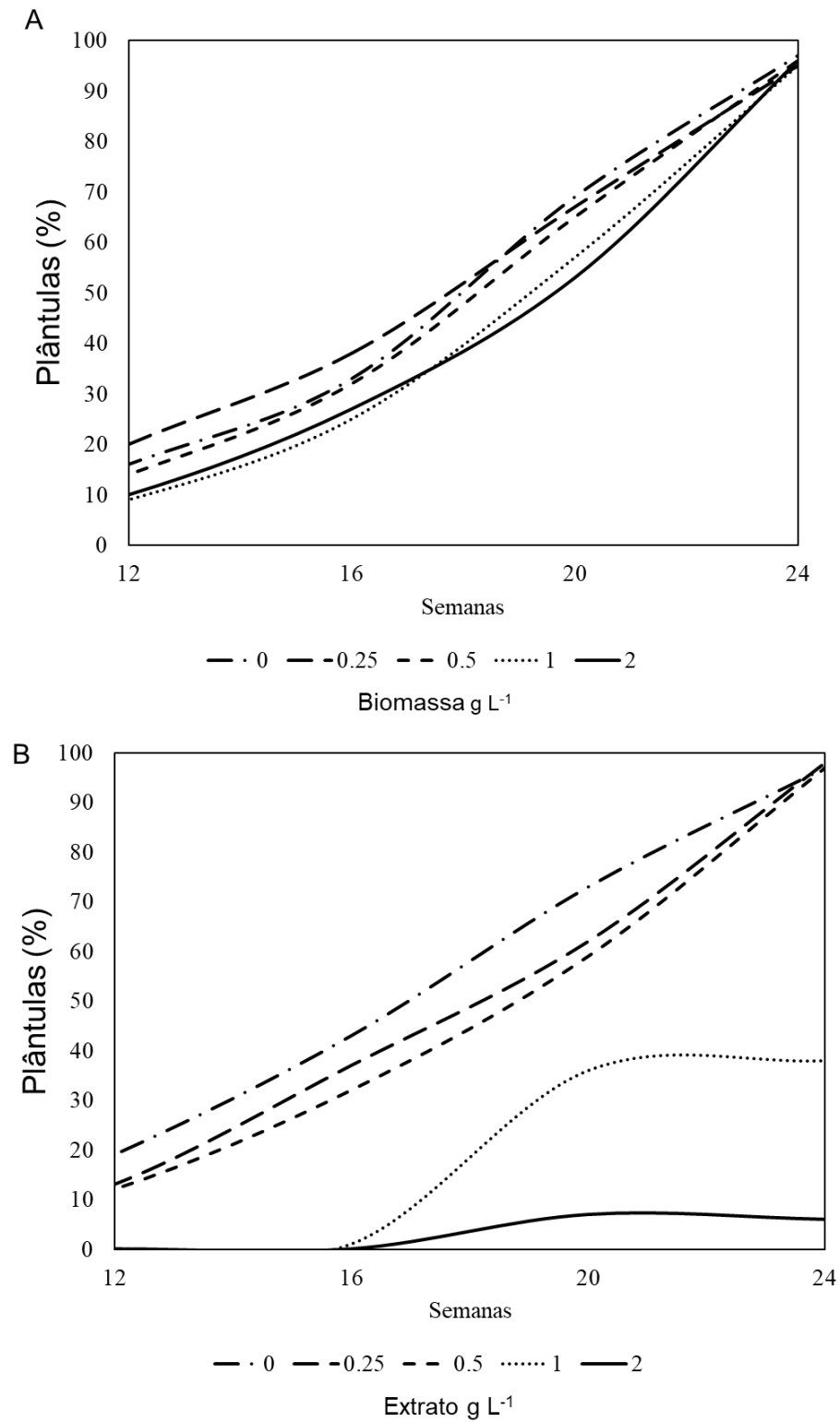
FONTE: A Autora (2020).

O estágio final da germinação *in vitro* é o de formação de plântulas que iniciou com 12 semanas e foi avaliado até 24 semanas (FIGURA 1F). No período de avaliação de 12 semanas, a adição de 0,25 g L⁻¹ de biomassa acelerou a formação de plântulas até o período de 16 semanas (Teste X², P ≤ 0,05, FIGURA 3A).

Os tratamentos sem adição e com 0,25 e 0,5 g L⁻¹ apresentaram elevadas porcentagens (68,9%; 66,7% e 65,3%, respectivamente) de formação de plântulas até o período de 20 semanas. Na avaliação final (24 semanas) não ocorreu diferenças entre os tratamentos (Teste X², P > 0,05, FIGURA 3A), com porcentagens de plântulas entre 95,1 a 96,8% (FIGURAS 3A e 5A-E).

Uma resposta semelhante ocorreu com os protocormos cultivados em meio contendo extrato (0; 0,25 e 0,5 g L⁻¹), com a formação de plântulas iniciando com 12 semanas, com diferenças significativas entre os tratamentos (Teste X², P ≤ 0,05). A porcentagem de plântulas desses tratamentos aumentou entre 20 e 24 semanas, sendo obtidas 97,2%; 98,3% e 96,5%, respectivamente (FIGURA 3B, Teste X², P ≤ 0,05). Nos tratamentos com adição de 1 e 2 g L⁻¹ de extrato, a formação de plântulas iniciou com 16 semanas e a porcentagem formada foi significativamente inferior após 24 semanas da sementeira (38,3% e 6,9%, respectivamente) (FIGURA 3B; Teste X², P ≤ 0,05).

FIGURA 3 – PORCENTAGEM DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri*, CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) E SUPLEMENTADOS COM: **A-** BIOMASSA E **B-** EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*, APÓS 12 E 24 SEMANAS.



FONTE: A autora (2020).

3.3.3 Comparação do efeito da adição de biomassa e extrato na germinação assimbiótica

A adição de biomassa no meio de cultura MSM/2 acelerou a germinação de sementes de *C. warneri*, após quatro, oito e doze semanas. No entanto, constatou-se que com a concentração de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, apesar da germinação ter sido apenas maior do que a da testemunha, ocorreu a maior aceleração inicial da germinação no período de quatro a 16 semanas (ANEXO 2). Os meios de cultura contendo as concentrações mais elevadas de biomassa ($0,5$; $1,0$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$) apresentaram as maiores porcentagens de germinação inicial e com a maior concentração ocorreu primeiro a germinação máxima ($100,0\%$). A menor taxa de aceleração da germinação ocorreu no meio sem adição de biomassa (ANEXO 2, FIGURA 4A).

A partir de dezesseis semanas não houve diferença significativa das porcentagens de germinação entre os tratamentos com adição de biomassa. Nas últimas avaliações (20 e 24 semanas) foram constatadas elevadas porcentagens de sementes germinadas em todos os tratamentos incluindo no meio sem adição de biomassa. Como os pontos de máxima da germinação nos meios com concentrações de $0,25$; $0,5$; $1,0$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ocorreram no mesmo período entre 12 e 16 semanas, recomenda-se a adição de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ para acelerar a germinação de sementes de *C. warneri* (FIGURA 4A).

As sementes cultivadas em meio MSM/2 contendo $0,25$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de extrato apresentaram as maiores porcentagens de germinação, atingindo as melhores respostas após doze semanas da semeadura *in vitro*, enquanto a porcentagem do meio sem extrato foi máxima após dezesseis semanas (FIGURA 4B, ANEXO 2). Apesar da germinação inicial com adição de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de extrato ter sido maior do que com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ no período de quatro semanas de semeadura, após 12 semanas ocorreu o inverso. A partir de 12 semanas de cultivo, as concentrações de $0,25$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ já tinham atingido o ponto de máxima da germinação, com isso, a menor concentração de extrato também pode ser recomendada (FIGURA 4B, ANEXO 2).

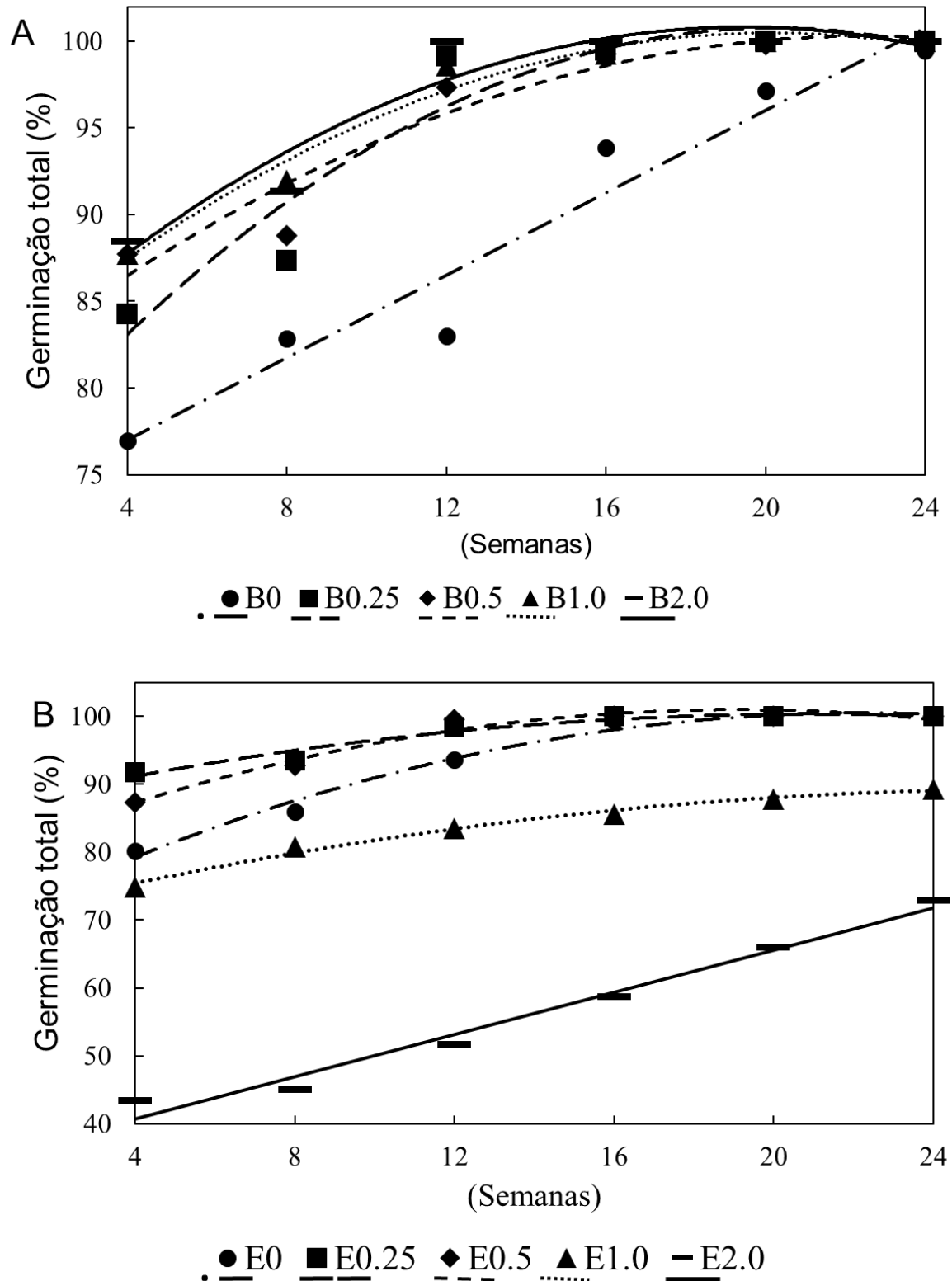
As concentrações mais elevadas de extrato ($1,0$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$) não foram adequadas, pois as sementes apresentaram germinação mais lenta e porcentagens inferiores, inclusive quando comparada com a do meio sem extrato. A maior inibição

ocorreu com adição de 2 g L⁻¹ de extrato, com porcentagem inferior a 70%, após 24 semanas da semeadura (FIGURA 4B).

Para a formação de plântulas, os períodos de 20 e 24 semanas não influenciaram as respostas obtidas com adição de biomassa (FIGURAS 5A-5E) e extrato (0,25 e 0,5 g L⁻¹, FIGURAS 5F-5H), com porcentagens maiores que 95%. A adição de 1 e 2 g L⁻¹ de extrato inibiu a formação de plântulas (38,9% e 6,9%, respectivamente, FIGURAS 5I E 5J).

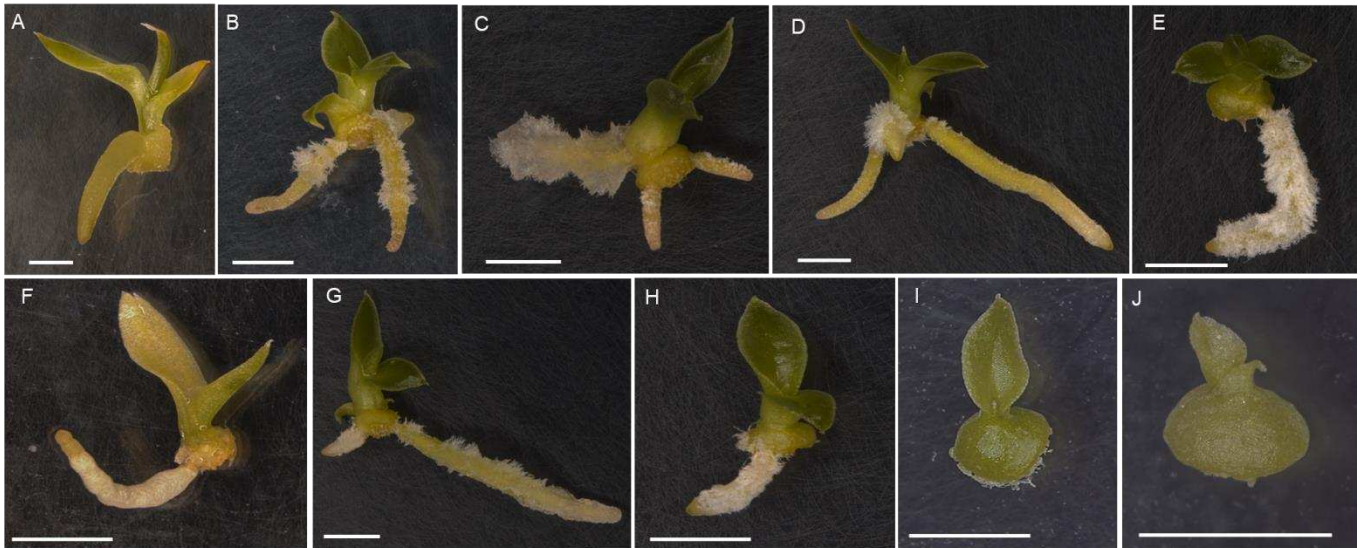
Ao compararmos as figuras 4A e 4B constatou-se que com o aumento das concentrações de biomassa ocorreu maior germinação inicial, enquanto com adição de extrato ocorreu o inverso, com as maiores concentrações inibindo a germinação. Sendo assim, a adição de biomassa ou extrato acelera a germinação sendo recomendada a menor concentração testada (0,25 g L⁻¹).

FIGURA - 4 PORCENTAGEM TOTAL DE SEMENTES GERMINADAS DE *Cattleya warneri* CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM: **A:** BIOMASSA **B:** EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* APÓS: QUATRO, OITO, DOZE, DEZESSEIS, VINTE E VINTE E QUATRO SEMANAS DA SEMEADURA *IN VITRO*.



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 5- GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *Cattleya warneri* EM MEIO MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), COM ADIÇÃO DE BIOMASSA OU EXTRATO DE *Desmodemus subspicatus*, APÓS 24 SEMANAS DE CULTIVO: **A-E**: PLÂNTULAS OBTIDAS EM MEIO COM BIOMASSA (g L^{-1}): **A**- 0; **B**- 0,25; **C**- 0,5; **D**- 1,0; **E**- 2,0; **F-H**: PLÂNTULAS OBTIDAS EM MEIO COM EXTRATO (g L^{-1}): **F**- 0; **G**- 0,25; **H**- 0,5; **I-J** PROTOCORMOS COM UMA FOLHA, EM MEIO CONTENDO; **I**- 1,0 E **J**- 2,0 g L^{-1} DE EXTRATO. (Barras= 2mm).



FONTE: A autora (2020).

3.4 ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO

As plântulas formadas da germinação assimbiótica se desenvolveram muito pouco em meio MSM/2, independente da presença de biomassa ou extrato, por dois subcultivos (FIGURA 14A), com isso, foram transferidas para meio suplementado com carvão ativado.

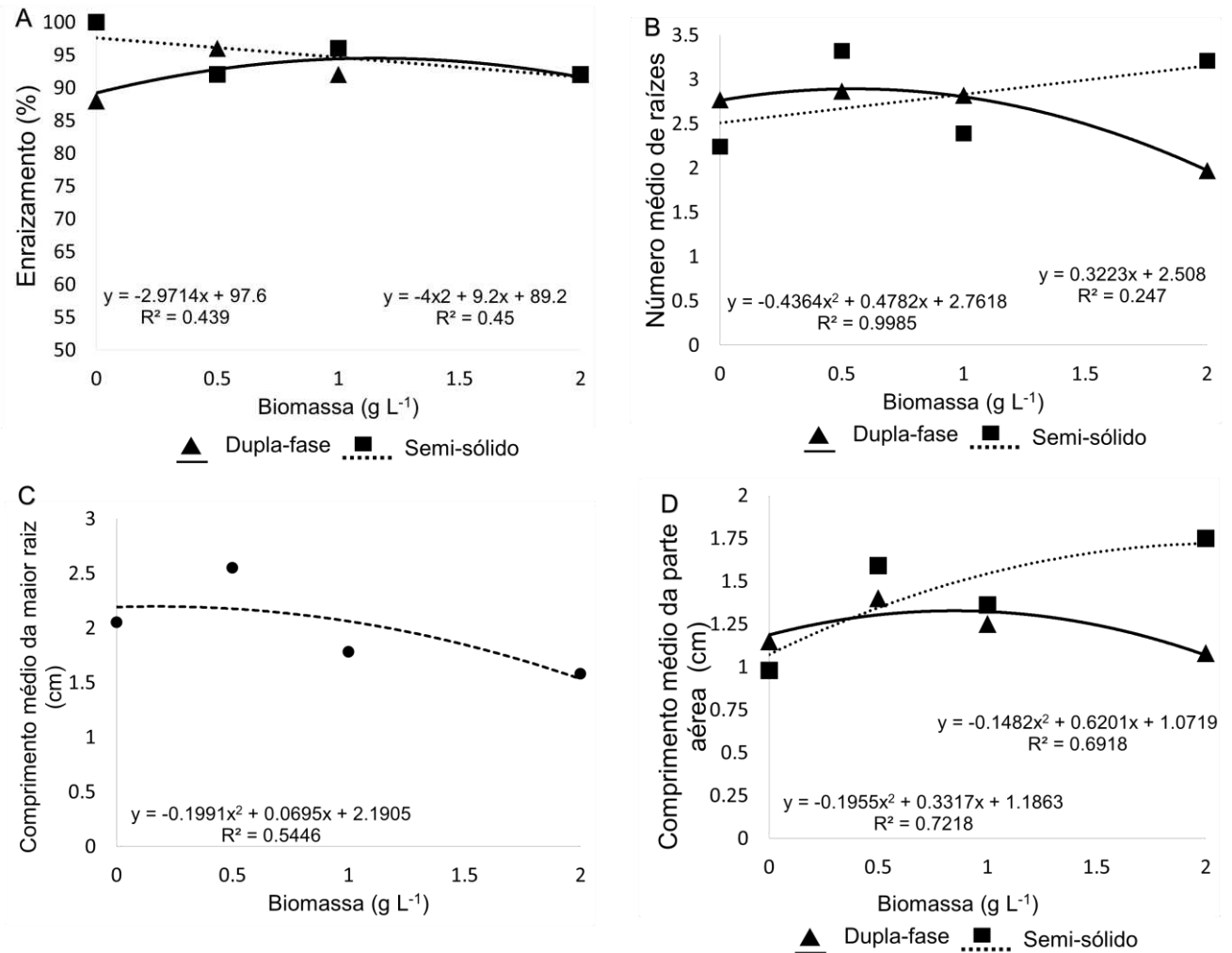
3.4.1 Efeito da consistência do meio de cultura e da biomassa de *D. subspicatus*

A porcentagem de enraizamento foi elevada (superior a 90%), tanto no meio dupla fase, como no meio semi-sólido (FIGURA 6A). Os números médios de raízes e os comprimentos médios das partes aéreas obtidas no meio de consistência semi-sólida, com carvão ativado, vindo do meio com 2 g L^{-1} de biomassa foram superiores aos dos meios de consistência dupla-fase (FIGURAS 6B e 6D). Os explantes cultivados no meio dupla fase com 2 g L^{-1} de biomassa apresentaram o menor número médio de raízes (FIGURA 6B). A melhor resposta do comprimento médio da maior raiz ocorreu no meio sem adição de biomassa, com o comprimento reduzindo à medida que aumentou a concentração (1 e 2 g L^{-1}) (FIGURA 6C).

O menor comprimento da parte aérea ocorreu com as plantas cultivadas em meio semi-sólido e sem adição de biomassa (FIGURA 6D). A análise da figura 7A indicou melhor resposta de massa fresca para as plantas cultivadas em meio semi-sólido vindas do meio com 2 g L⁻¹ de biomassa, e o com 0,5 g L⁻¹ de biomassa no meio dupla-fase (FIGURA 7A). A análise das figuras 7B e 7C indicou que a porcentagem de brotações e o número médio de brotos por explante seria maior se fosse adicionada 1,5 g L⁻¹ de biomassa.

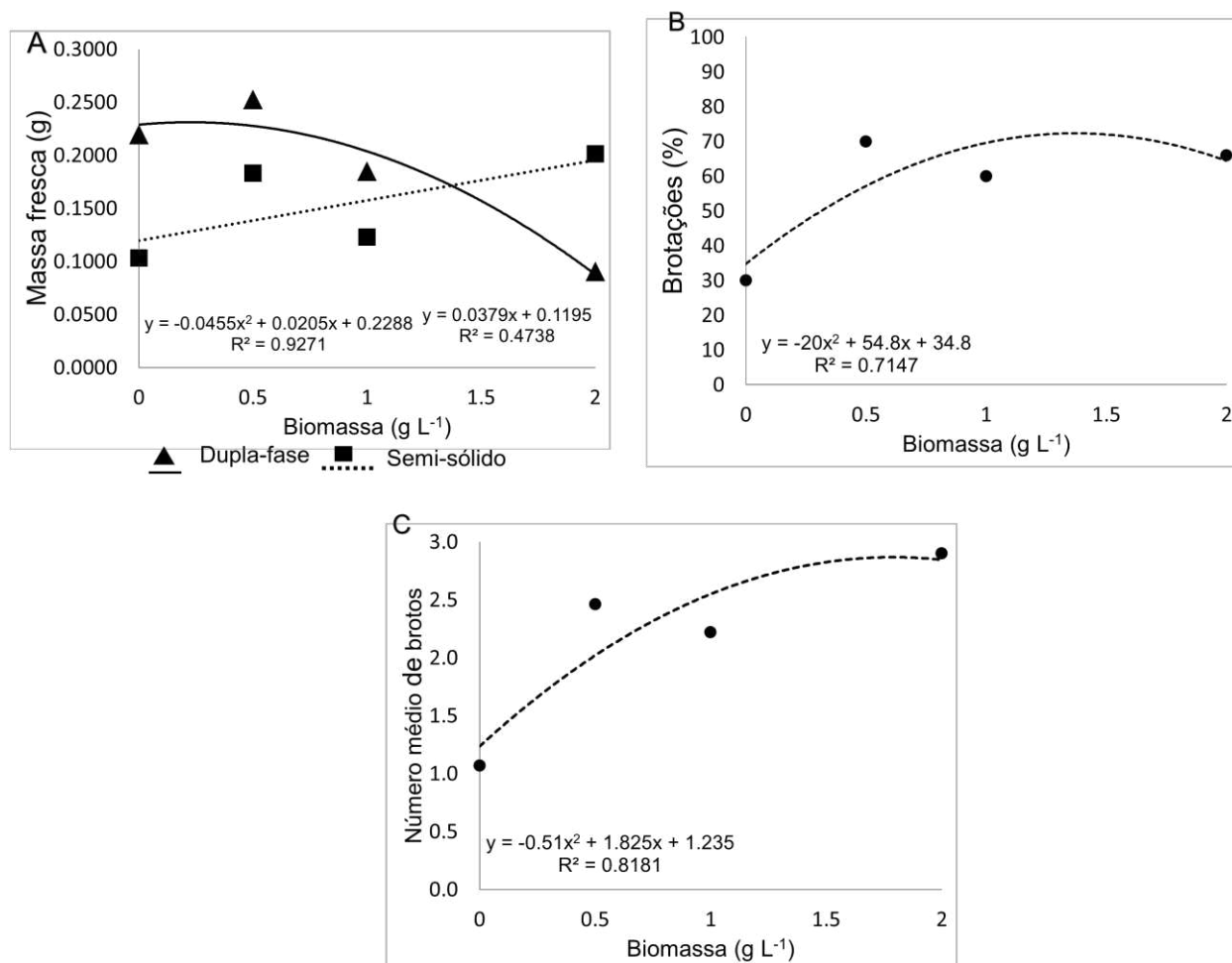
A análise conjunta dos dados revelou que para promover maior alongamento da parte aérea e enraizamento recomenda-se utilizar explantes cultivados na maior concentração de biomassa (2 g L⁻¹) e transferidos para meio MSM/2, semi-sólido, contendo 2 g L⁻¹ de carvão ativado. A adição das concentrações mais elevadas de biomassa (1 e 2 g L⁻¹) no meio dupla-fase proporcionou melhor respostas de brotações, recomendando-se testar a concentração de 1,5 g L⁻¹.

FIGURA 6 - A LONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DE *Cattleya warneri*, CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO +10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM ADIÇÃO DE BIOMASSA DE *Desmodemus subspicatus* (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 7 - MASSA FRESCA E BROTAÇÕES DE *Cattleya warneri*, CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO +10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM ADIÇÃO DE BIOMASSA DE *Desmodemus subspicatus* (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.



FONTE: A autora (2020).

3.4.2 Efeito da consistência do meio de cultura e adição de extrato de *Desmodemus subspicatus*

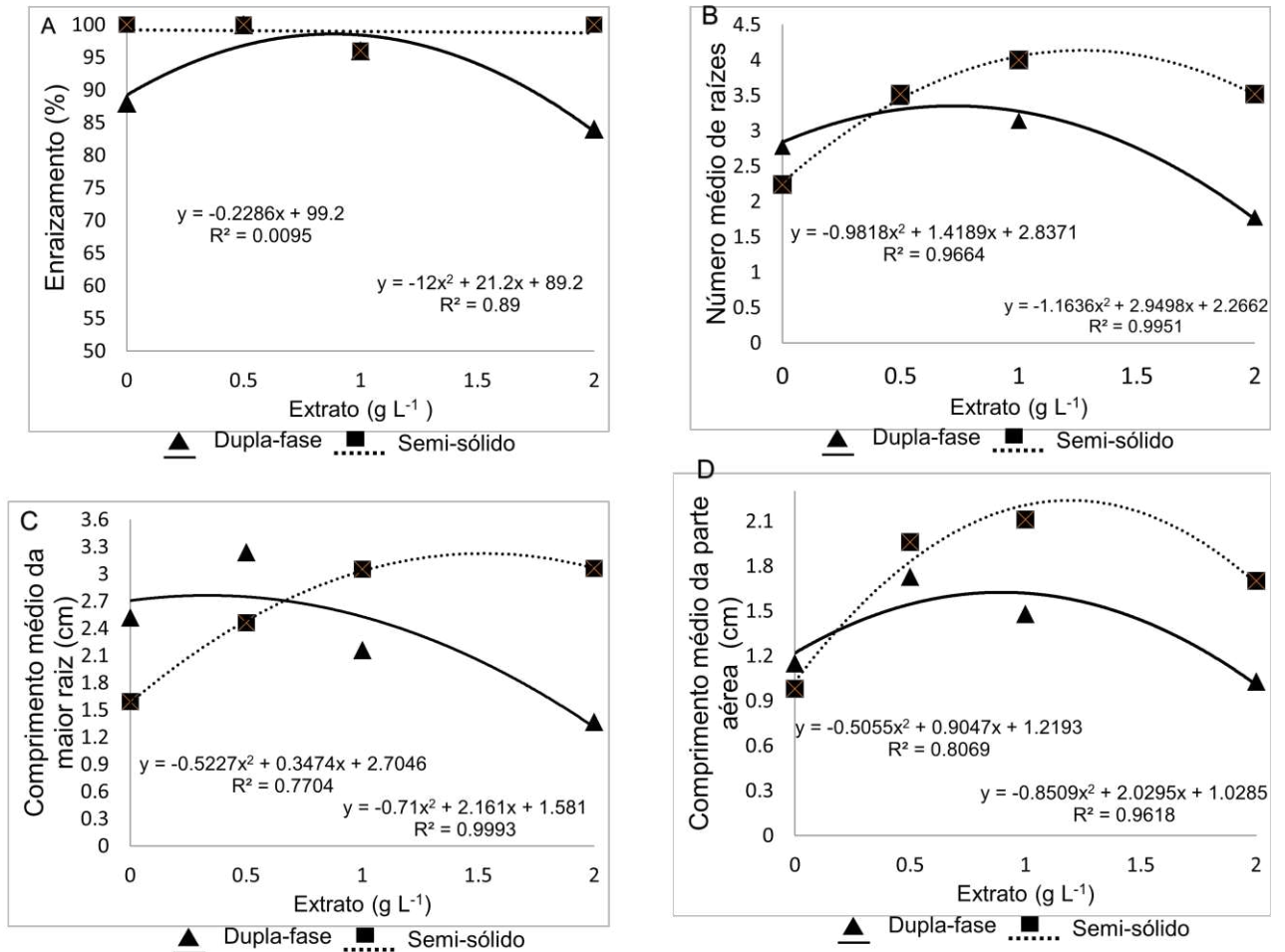
As porcentagens de enraizamento foram elevadas, com a pior resposta das plantas cultivadas nos meios de consistência dupla-fase com 2 g L⁻¹ de extrato (84 %) (FIGURA 8A). A avaliação das variáveis: número médio de raízes, comprimento médio da maior raiz, comprimento médio da parte aérea e massa fresca das plantas cultivadas em meio de consistência semi-sólida, com carvão ativado vindas do meio com 2 g L⁻¹ de extrato apresentaram resultados superiores aos dos meios de consistência dupla-fase. Para essas variáveis constatou-se melhores respostas com

explantes vindos do meio semi-sólido, com concentrações entre 1 e 1,5 g L⁻¹ de extrato e as piores ocorreram nos explantes cultivados sem extrato (FIGURAS 8B, 8C, 8D e 9A).

A consistência do meio de cultura influenciou as porcentagens de brotações, sendo que foram maiores (62%) nos explantes do meio dupla-fase do que às do o semi-sólido (27%) (FIGURA 9B). Ao contrário do observado com as outras variáveis, o número médio de brotos dos meios de consistência dupla fase contendo 0,5 a 2 g L⁻¹ de extrato foi superior ao do dos meios de consistência semi-sólida. A Fig. 9B demonstrou que a melhor resposta do número de brotos ocorreria com adição de 1,5 g L⁻¹ de extrato.

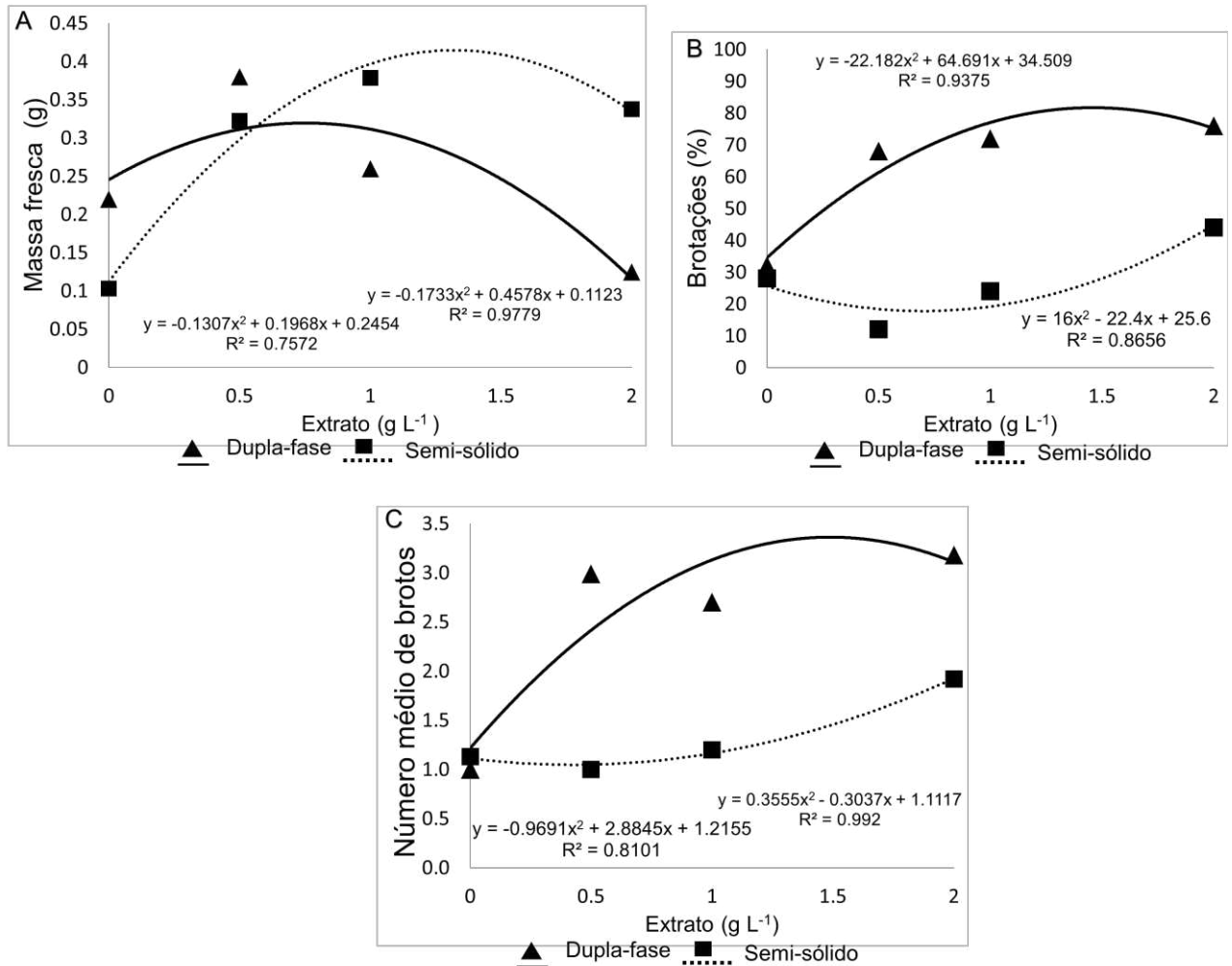
A análise conjunta dos dados revelou que para promover maior alongamento da parte aérea e enraizamento recomenda-se utilizar meio MSM/2, semi-sólido, contendo 2 g L⁻¹ de carvão ativado (FIGURAS 8D e 14B). O meio dupla-fase induziu melhores respostas de brotações, sendo indicado adicionar 1,5 g L⁻¹ de extrato na fase líquida do meio de cultura (FIGURA 9B, 9C e 14C).

FIGURA 8 - ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DE *Cattleya warneri*, CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM EXTRATO DE *Desmodemus subspicatus* (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.



FONTE: a autora (2020).

FIGURA 9 - *Cattleya warneri*, CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) SEMI-SÓLIDO, CONTENDO 2,0 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO), COM EXTRATO DE *Desmodemus subspicatus* (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.



FONTE: a autora (2020).

3.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS

Após 120 dias do transplântio, as plantas cultivadas em meio semi-sólido na etapa de alongamento apresentaram altas porcentagens de sobrevivência, sendo superiores às das mudas obtidas em meio dupla fase com adição de 2 g L⁻¹ de biomassa. Ao compararmos as plantas que foram cultivadas em diferentes concentrações vindas do meio dupla-fase, a porcentagem de sobrevivência obtida

das plantas pulverizadas com 2 g L⁻¹ de biomassa foi inferior à dos outros tratamentos (FIGURA 10A).

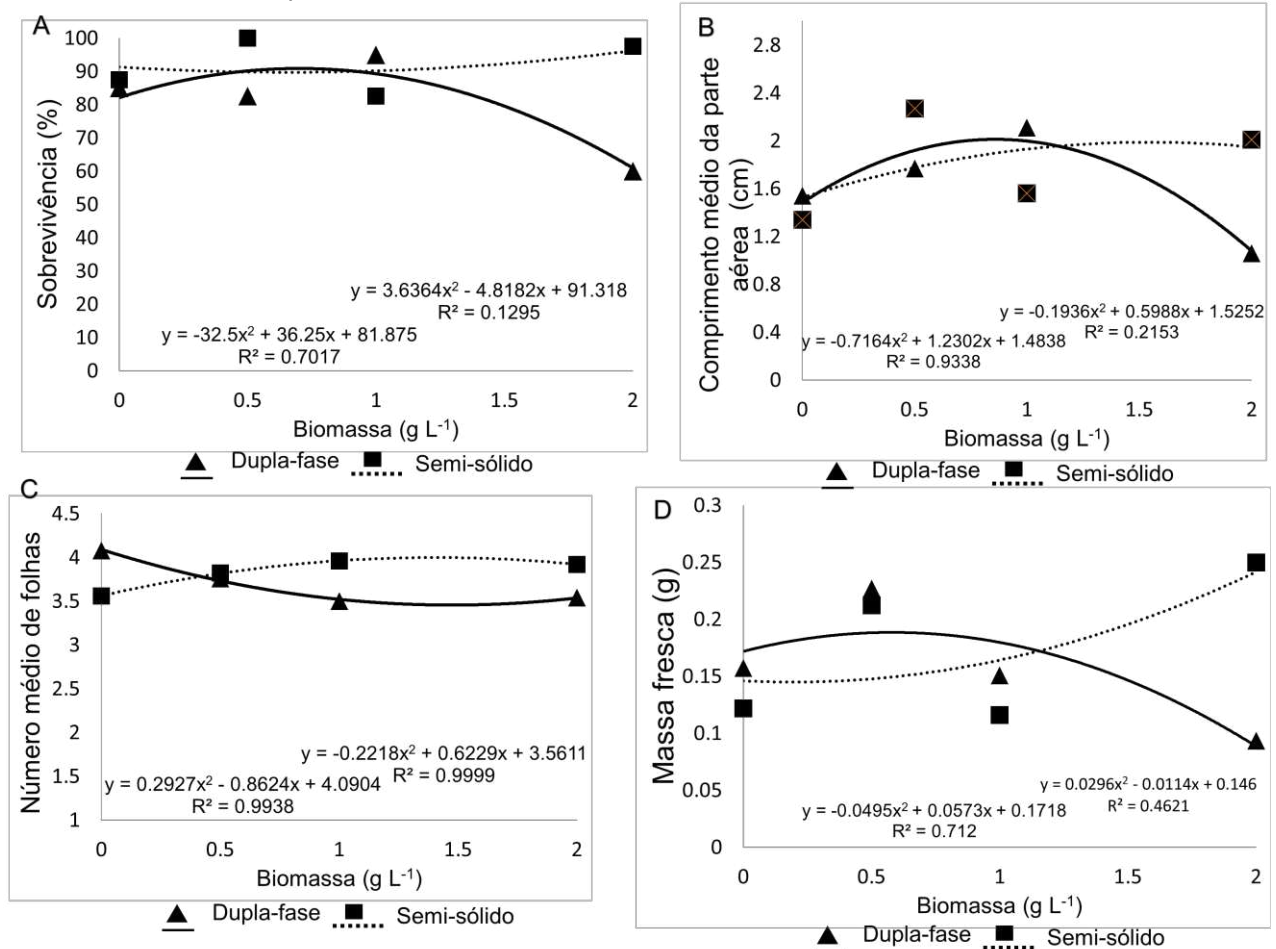
O comprimento da parte aérea foi maior em plantas que foram pulverizadas com 1,0 g L⁻¹ de biomassa, e que tinham sido cultivadas em meio de alongamento dupla fase com essa concentração. (FIGURA 10B). A Figura 10B indicou que a melhor resposta de comprimento de parte aérea de plantas do meio semi-sólido foi obtida com pulverização com 2,0 g L⁻¹ de biomassa.

O número de folhas para plantas pulverizadas com 1 e 2 g L⁻¹ de biomassa, no meio com carvão semi-sólido foi maior do que o do dupla-fase. As plantas vindas do meio dupla-fase, pulverizadas com fertilizante foliar comercial, obtiveram maior número de folhas do que às do meio com carvão semi-sólido pulverizadas com água (FIGURAS 10C e 14D). A massa fresca foi maior para plantas pulverizadas com 0,5 g L⁻¹ de biomassa, vindas do meio dupla fase do que à do meio semi-sólido com carvão ativado (FIGURA 10D). Para as plantas cultivadas em meio semi-sólido, a maior massa fresca ocorreu com a da concentração de 2 g L⁻¹ de biomassa (FIGURA 10D).

O número médio de raízes foi maior em plantas que foram cultivadas em meio dupla fase com adição de 1,0 g L⁻¹ de biomassa. Para as plantas cultivadas no meio semi-sólido com carvão na etapa de alongamento e pulverizadas com 2,0 g L⁻¹ de biomassa apresentaram maior número médio de raízes (FIGURA 11A). O comprimento da maior raiz foi maior para as plantas cultivadas no meio de alongamento dupla fase e pulverizadas com 0,5 g L⁻¹ de biomassa. Para as plantas vindas do meio semi-sólido, a melhor resposta de comprimento médio da maior raiz seria com pulverizações de 1,5 g L⁻¹ de biomassa e para as plantas cultivadas no meio dupla-fase e pulverizadas com 2 g L⁻¹ de biomassa obtiveram menor comprimento de raiz do que às cultivadas em meio semi-sólido (FIGURA 11B). Foi observado também que após o transplântio algumas raízes não sobreviveram e as plantas alongadas em meio dupla fase e pulverizadas com 2,0 g L⁻¹ de biomassa apresentaram alta mortalidade (75%) (FIGURA 11C).

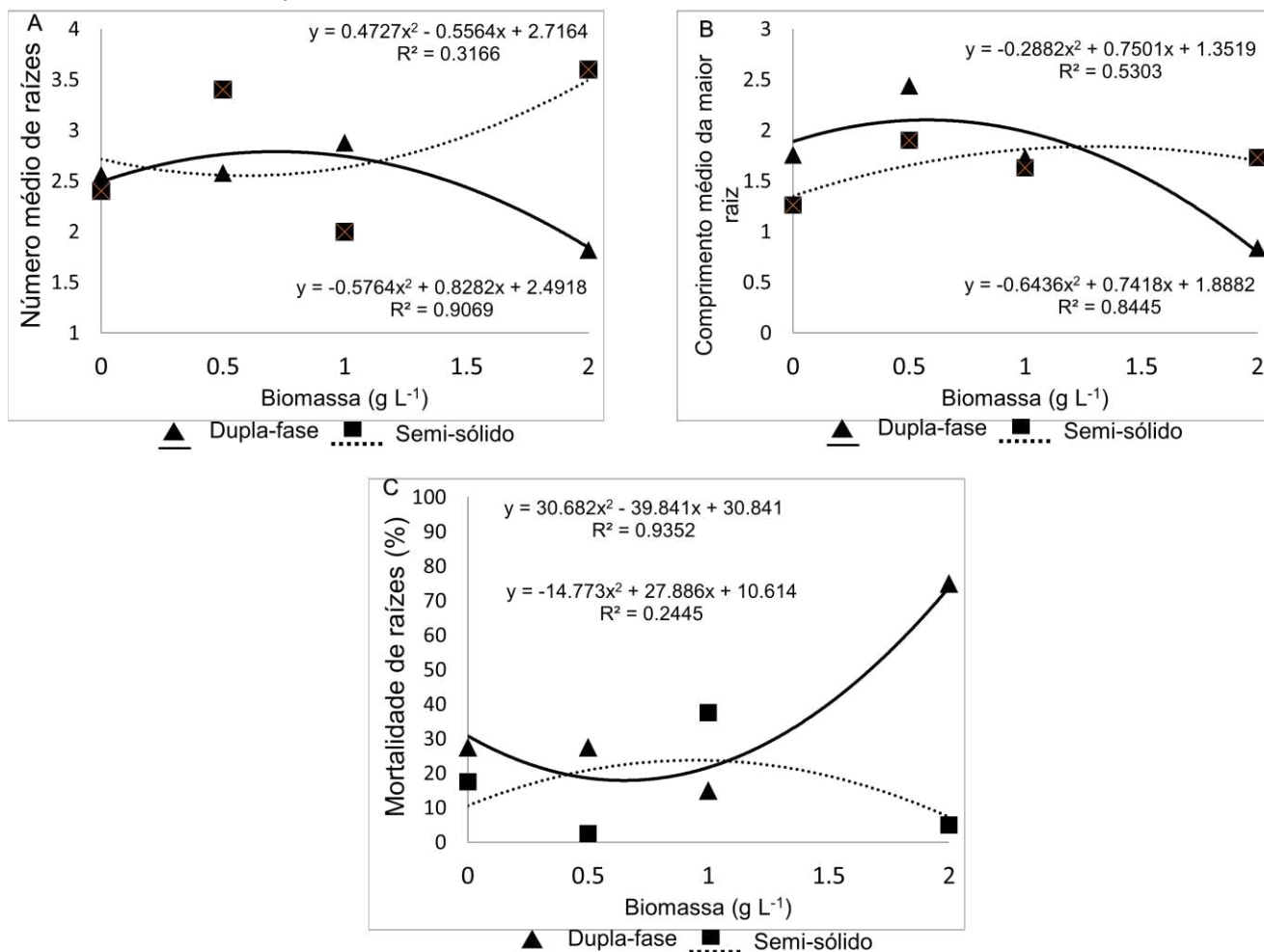
Analisando todas as variáveis, recomenda-se pulverizações realizadas a cada 15 dias por quatro meses com 2,0 g L⁻¹ de biomassa em plantas que foram cultivadas na etapa de alongamento no meio semi-sólido (FIGURAS 10A-10E, 14E).

FIGURA 10 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA, MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodemus subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.



FONTE: a autora (2020).

FIGURA 11 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA, MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodemus subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO



FONTE: a autora (2020).

Foram obtidas altas porcentagens de sobrevivência para as plantas vindas do meio de alongamento semi-sólido com carvão ativado e a análise da figura 12A indicou que as plantas devem ser pulverizadas com 1,0 g L⁻¹ de extrato (FIGURA 12B). No entanto, as plantas alongadas em meio dupla-fase apresentaram redução na sobrevivência a partir de 1 g L⁻¹ de extrato, enquanto que as plantas pulverizadas com 2,0 g L⁻¹ de extrato apresentaram apenas 47,5 % de sobrevivência (FIGURAS 12A e 14G).

O comprimento médio da parte aérea das plantas alongadas em meio semi-sólido, com carvão ativado foram maiores do que os do dupla-fase, com melhor

resposta das plantas pulverizadas com 1 g L^{-1} de extrato (FIGURA 14F) e a pior com as plantas controle (FIGURA 12B). Para as plantas cultivadas no meio dupla-fase ocorreu uma inibição do comprimento com pulverização com 2 g L^{-1} de extrato (FIGURAS 12B e 14G).

O número de folhas de plantas vindas do meio dupla fase e pulverizadas com extrato apresentou um decréscimo à medida que as plantas foram pulverizadas com maiores concentrações de extrato. Para as plantas vindas do meio com carvão, o número de folhas não variou, sendo que com 2 g L^{-1} foi superior ao das plantas do meio dupla-fase (FIGURA 12C).

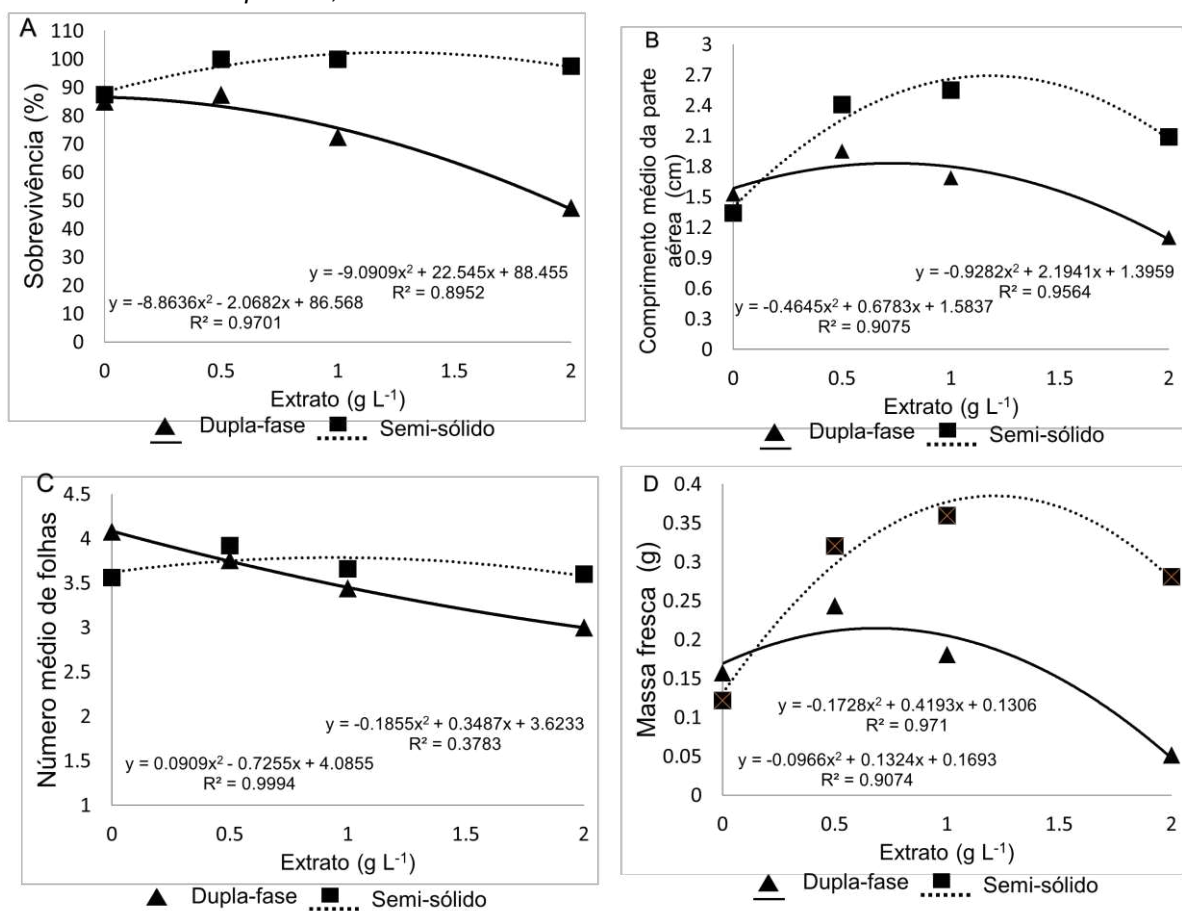
Para as plantas alongadas em meio de consistência semi-sólido e pulverizadas com todas as concentrações de extrato apresentaram melhor resposta de massa fresca do que às do meio dupla- fase, e a maior massa fresca ocorreu com 1 g L^{-1} de extrato (FIGURA 12D). Para plantas vindas do meio de alongamento dupla fase, a massa fresca também foi maior com pulverizações 1 g L^{-1} de extrato, com redução nas plantas pulverizadas com a maior concentração (FIGURA 12D).

As plantas vindas do meio semi-sólido na etapa de alongamento apresentaram maiores números médios de raízes do que às do dupla-fase e com às pulverizadas com $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato ocorreu a melhor resposta (FIGURA 13A). Para as plantas vindas do meio dupla-fase, o menor número médio de raízes foi obtido com pulverização de 2 g L^{-1} de extrato (FIGURAS 13A e 14G). Para as plantas vindas do meio com carvão e pulverizadas com $1,0$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ extrato apresentaram melhores respostas de comprimento da raiz do que às do controle (FIGURA 13B). O menor comprimento de raiz de plantas vindas do meio dupla fase ocorreu com adição de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato (FIGURA 13C). A mortalidade das raízes foi elevada em plantas que vieram do meio dupla fase, cultivadas e pulverizadas com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato (FIGURA 13C).

Após a análise em conjunto de todas as variáveis, recomenda-se utilizar as plantas que alongaram no meio MSM/2, semi-sólido com carvão ativado e pulverizadas a cada 15 dias com $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato, por quatro meses, pois apresentaram maior sobrevivência e desenvolvimento da parte aérea e de raízes (FIGURAS 12A a 13B). O cultivo de plantas em meio dupla-fase com 2 g L^{-1} de extrato, bem como as pulverizações com essa concentração não são recomendadas, pois as plantas apresentaram redução da sobrevivência, inibição do desenvolvimento da parte aérea e de raízes (FIGURAS 12A a 13C). A comparação

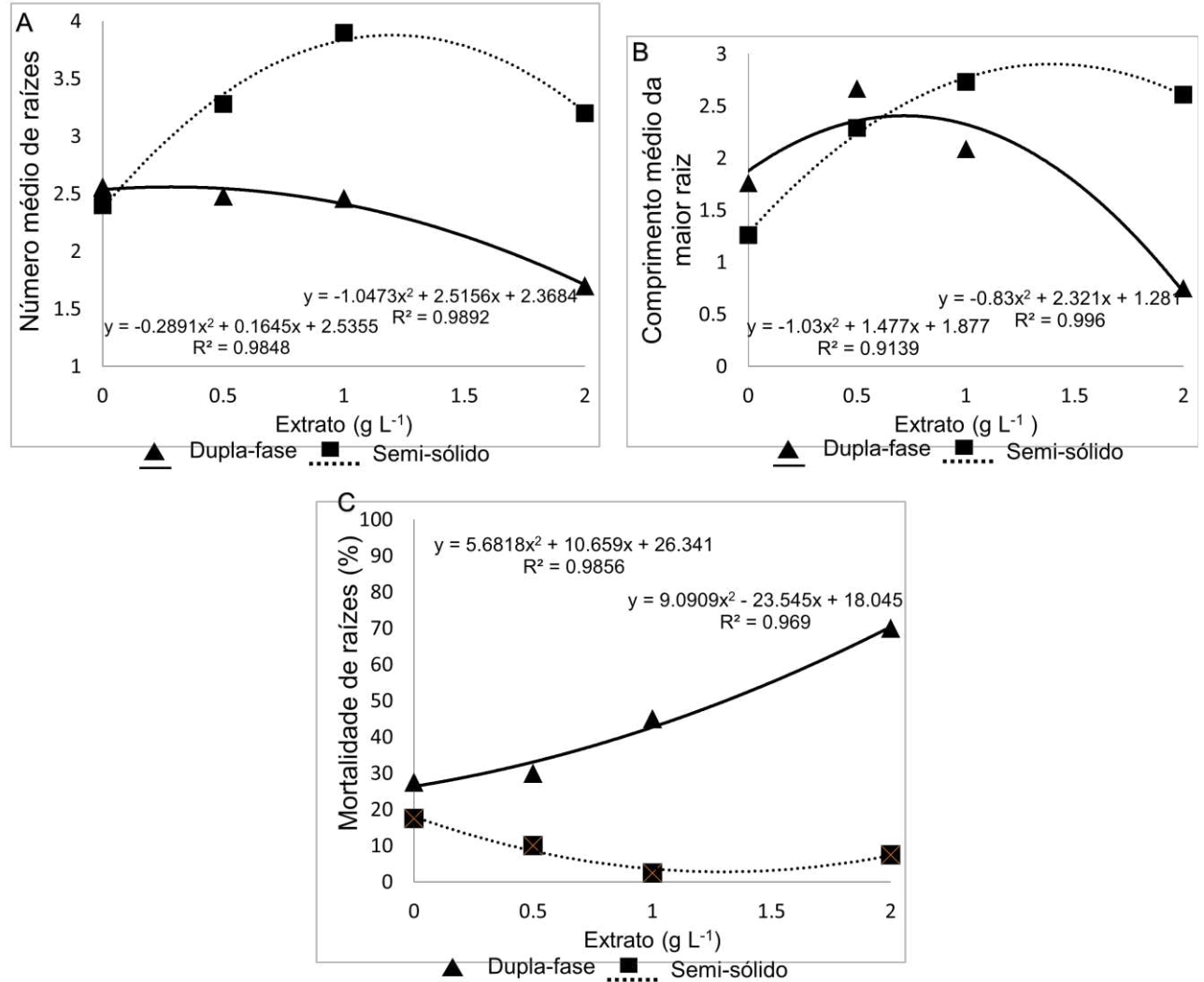
das plantas pulverizadas com extrato e biomassa indicou que o meio usado durante a etapa de alongamento influenciou as respostas de aclimatização. As plantas cultivadas em meio semi-sólido contendo carvão ativado apresentaram maior alongamento, independente da adição de biomassa ou extrato (FIGURA 14B). O meio dupla-fase, suplementado com extrato favoreceu a formação de brotos e de novas plantas (FIGURA 14 C), provavelmente devido à presença de zeatina na composição do extrato, sendo isso, uma grande vantagem para a propagação massal de plantas. No entanto, essas plantas eram menores, com menor massa fresca e poucas folhas.

FIGURA 12 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA, MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodium subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.



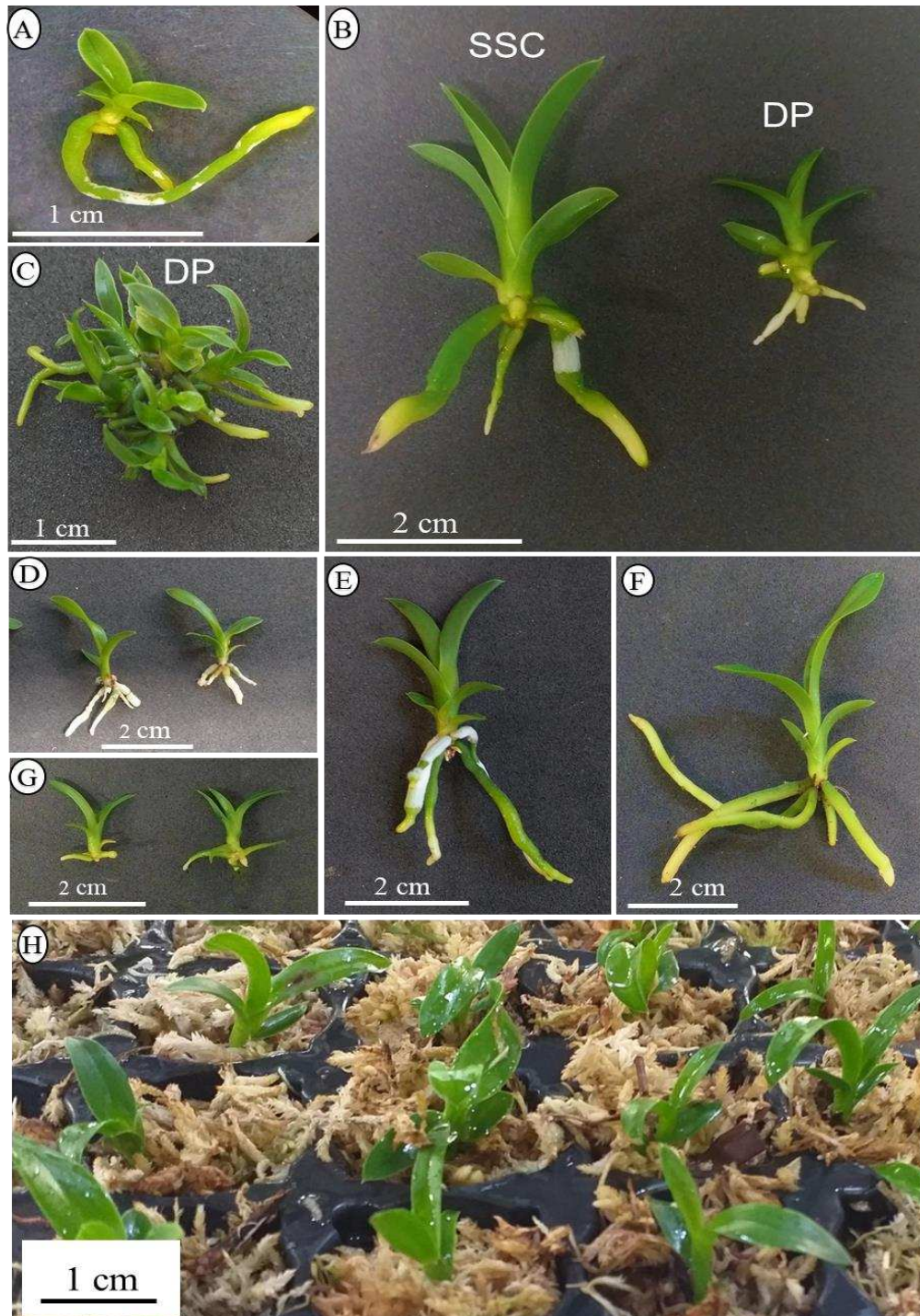
FONTE: a autora (2020).

FIGURA 13 - ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* QUE FORAM ANTERIORMENTE CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA, MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) SUPLEMENTADO COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SEMI-SÓLIDO) OU DUPLA-FASE (SEMI-SÓLIDO + 10 ML DE MEIO LÍQUIDO) E PULVERIZADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO (0; 0,5; 1,0 E 2,0 g L⁻¹) DE *Desmodemus subspicatus*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO.



FONTE: a autora (2020).

FIGURA 14. ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES DE *Cattleya warneri*. **A**- PLÂNTULA CULTIVADA EM MEIO MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE); **B**- PLÂNTULA CULTIVADA EM MEIO SEMI-SÓLIDO, COM 2 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO (SSC) E EM MEIO DUPLA-FASE (DF)= 10 ML DE MEIO LÍQUIDO CONTENDO 2 g L⁻¹ DE EXTRATO DE *Desmodemus subspicatus*, SOBRE SSC; **C**- BROTAÇÕES FORMADAS EM MEIO DF COM 2 g L⁻¹ DE EXTRATO; **D**- PLANTAS VINDAS DO MEIO SSC E PULVERIZADAS COM ÁGUA; **E**- PLANTAS VINDAS DO MEIO SSC E PULVERIZADAS COM 2 g L⁻¹ DE BIOMASSA; **F**- PLANTAS VINDAS DO MEIO SSC E PULVERIZADAS COM 1 g L⁻¹ DE EXTRATO; **G**- PLANTAS VINDAS DO MEIO DF E PULVERIZADAS COM 2 g L⁻¹ DE EXTRATO; **H**- PLANTAS ACLIMATIZADAS E PULVERIZADAS COM 1 g L⁻¹ DE EXTRATO, APÓS QUATRO MESES EM CASA DE VEGETAÇÃO.



FONTE: A autora (2020).

4 DISCUSSÃO

As sementes de *C. warneri* apresentaram elevada viabilidade após 14 meses de armazenamento em refrigerador (4°C). O teste do tetrazólio indicou 87,5% de viabilidade e alta germinabilidade *in vitro* (93,6%) em meio de cultura MSM/2. Esses resultados indicaram que as condições de armazenamento desse estudo foram adequadas e as sementes apresentaram comportamento ortodoxo. Resultados semelhantes foram obtidos por Hengling *et al.* (2020), ao avaliarem a germinação de sementes de *C. warneri* armazenadas por três meses em baixas temperaturas (5°C, -18°C e -196°C) e germinadas em meio MS/2 após 90 dias. As sementes apresentaram 80% de germinação. Essas sementes apresentaram tolerância à baixas temperaturas. No entanto, nem a dessecação e nem as baixas temperaturas permitiram preservação prolongada de capacidade de germinação, sendo essas sementes classificadas como sementes de curta duração com menos de 25 anos (HENGLING *et al.*, 2020).

Na primeira semana da semeadura já foram visualizados embriões clorofilados em meio de cultura MSM/2 e a partir da segunda semana, observou-se protocormos clorofilados, indicando o início da germinação de *C. warneri*. Esse estágio foi observado com maior frequência após quatro semanas de semeadura nos tratamentos com 2,0 g L⁻¹ de biomassa (85,3%) e 0,5 g L⁻¹ de extrato (53,7%). Resultado semelhante foi obtido por Schneider *et al.* (2014) para a mesma espécie, que após testarem várias formulações de meios de cultura, sem e com adição de polpa de banana, também recomendaram o meio MSM/2, sem complemento adicional por obterem o maior número de protocormos clorofilados (389,25) após 16 semanas. Devi *et al.* (2015) também observaram na germinação de *Taprobanea spathulata* em meio MS/2 que ocorreu a formação de 178.20 protocormos (92,73%), após oito semanas.

O período de 12 semanas após a semeadura foi o mais indicado para avaliar os estádios iniciais de germinação de *C. warneri* (protocormo clorofilado e com ápice/e ou rizóides) e após esse período foi ocorrendo desenvolvimento dos protocormos em estádios mais avançados (com uma ou duas folhas) até a formação de plântulas, com avaliação final realizada com 24 semanas da semeadura. Resultados semelhantes foram obtidos para *Aerides ringens* com formação de

protocormos em meio MS/2, após quatro e cinco semanas e formação de plântulas após 9, 14 e 18 semanas (PYATI, 2019).

Após 12 semanas da semeadura, os protocormos obtidos dos meios de cultura suplementados com biomassa (0,25 a 2,0 g L⁻¹) apresentaram elevadas porcentagens de germinação (97,3% a 100,0%), sendo significativamente superiores às do meio sem adição de biomassa. Esses resultados indicaram que os componentes da biomassa (carboidratos, proteínas, lipídios e zeatina) podem ter auxiliado nessa etapa de germinação inicial.

Na avaliação final, após 24 semanas da semeadura não houve diferença entre os tratamentos, sem ou com adição de biomassa, em relação ao número de plântulas formadas. Estudo com outra microalga (*Scenedesmus obliquus*) também demonstrou um efeito positivo na germinação *ex vitro* de sementes de agrião, no qual, as sementes foram pré- tratadas com 0,1 g L⁻¹ de biomassa e colocadas em placa de petri com papel filtro, proporcionando 40% de aumento na germinação (NAVARRO-LÓPEZ *et al.*, 2020). Assim como no presente estudo, os tratamentos com biomassa aceleraram a germinação inicial de sementes de *C. warneri*.

Os resultados indicaram que o meio MSM/2 foi apropriado para germinação e formação de plântulas de *C. warneri*, pois foram obtidas aproximadamente 95% de plântulas após 24 semanas. Em alguns estudos com orquídeas, o meio de cultura recomendado para a germinação não é o mesmo indicado para a formação de plântulas e essa troca de meios pode acarretar num aumento de custo para produção de mudas. Koene *et al.* (2019) observaram que, na germinação de sementes de *Acianthera prolifera*, o meio MS/2 foi mais eficiente no início da germinação e o meio WPM foi mais adequado para formação de plântulas. No presente estudo, apenas os macronutrientes do meio MS foram reduzidos pela metade e esse meio foi eficiente até a formação de plântulas, independente da adição de biomassa ou extrato (97%) após 24 semanas da semeadura. Existe variação de meios recomendados para a germinação de diferentes gêneros e espécies de orquídeas, sendo que o MSM/2 também apresentou melhores respostas para a germinação de *Cattleya intermedia* e *C. warneri* (SCHNEIDER *et al.*, 2014) e para o desenvolvimento de plântulas de *C. intermedia* (SASAMORI *et al.*, 2015).

Nos tratamentos com extrato, as avaliações indicaram que após quatro a doze semanas de cultivo houve maiores porcentagens de germinação nos meios suplementados com: 0,25 e 0,5 g L⁻¹ (98,5 e 99,5%, respectivamente). As

concentrações mais elevadas de extrato (1,0 e 2,0 g L⁻¹) não foram recomendadas, pois a germinação foi mais lenta e com porcentagens inferiores resultando em menor número de plântulas formadas, inclusive quando comparadas com as do meio sem extrato. A maior inibição ocorreu com adição de 2 g L⁻¹ de extrato, com 51,7% de germinação após 12 semanas e porcentagem inferior a 72,9%, após 24 semanas da semeadura. Resultado diferente foi obtido por Corrêa (2019), ao avaliar o efeito do extrato da mesma microalga no meio MSM/2, constatando-se que com adição de 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de extrato ocorreu maior desenvolvimento dos protocormos e as concentrações mais elevadas testadas (4,0 e 8,0 g L⁻¹) inibiram o desenvolvimento das sementes de *C. warneri*, após 12 semanas da semeadura. A principal diferença foi do tempo de armazenamento das sementes em refrigerador, que foi de 14 meses no presente estudo e de 6 meses no estudo de Corrêa (2018), além do extrato da microalga ter sido obtido de outro cultivo de *D. subspicatus*.

O uso de outras algas, com outras espécies também indicaram efeito positivo na germinação *ex vitro*. A adição de concentrações superiores a 50% (0,75 g mL⁻¹) de extrato da microalga *Acutodesmus dimorphu* em placa de petri contendo papel filtro acelerou a germinação *ex vitro* de sementes de tomate e melhorou o crescimento das plântulas (GARCIA-GONZALEZ e SOMMERFEL., 2016). Outra resposta positiva de adição de 0,5 g L⁻¹ do extrato de *Scenedesmus obliquus* foi constatada por Navarro-López *et al.* (2020), na germinação de feijão e pepino, com um aumento em até 60% da formação de radículas de feijão e pepino, quando comparada com o controle. A adição de 2 g L⁻¹ de extrato promoveu maior expansão radicular (até 187,5%, em relação ao controle) de sementes de pepino.

A adição de biomassa no meio de cultura MSM/2 ocasionou uma maior aceleração da germinação inicial de sementes de *C. warneri* do que com extrato. A análise da composição bioquímica de biomassa seca da microalga *D. subspicatus* indicou a presença de carboidratos, proteínas, lipídios e zeatina, sendo que os compostos orgânicos foram detectados em maiores concentrações do que no extrato. Além disso, no extrato não foram detectados lipídios, apesar da concentração de zeatina detectada ter sido mais de seis vezes maior, quando comparada à de biomassa. Provavelmente, esses compostos orgânicos estimularam a maior germinação inicial das sementes em meio contendo biomassa e o fato do extrato conter maior concentração de zeatina pode ter ocasionado inibição da germinação nas concentrações mais elevadas (1 e 2 g L⁻¹). Stirk *et al.* (2013) após

quantificar compostos químicos em 24 cepas de microalgas, dentre elas, a do mesmo gênero deste estudo *Desmodesmus armatus* (R. Chodat) verificaram que além da presença de citocininas, também ocorre a presença de auxinas, apesar de não terem sido identificadas no presente estudo, demonstrando com isso, que as microalgas possuem um grande potencial como bioestimulante na cultura de tecidos.

Estudos com bioestimulantes (biomassa ou extrato de microalgas) no cultivo e germinação *in vitro* ainda são muito escassos, principalmente na germinação de orquídeas, sendo comum a adição de compostos de composição indefinida, como: polpa de banana, água de coco, carvão ativado (SCHNEIDER *et al.*, 2014; UTAMI e HARIYANTO, 2019) e reguladores vegetais (FERREIRA *et al.*, 2017; PYATI *et al.*, 2019), os quais podem aumentar o custo de produção de mudas. Mercado e Contreras (2017) observaram que o processo de germinação da orquídea *Cattleya trianae* começou a formação de protocormos (com médias superiores a 90%) após 15 dias com a formação de protocormos em meio MS e MS, com adição de ácido giberélico (GA₃) e a formação de plântulas ocorreu após 20 semanas com uma média de 54,2% em meio MS suplementado com suco de abacaxi. Com isso, constatou-se que mesmo com adição de reguladores vegetais e de compostos de composição indefinida, a resposta de germinação de *C. trianae* foi inferior à obtida para *C. warneri*.

Após a formação de plântulas nos meios de cultura, sem e com adição de biomassa ou extrato é necessário um subcultivo em frascos para estimular o alongamento, pois as placas de Petri impedem que isso ocorra. Para essa etapa, a adição de biomassa da microalga ao meio de cultura MSM/2, nas mesmas concentrações testadas na germinação não foi eficiente para estimular o alongamento das plântulas de *C. warneri*, tanto no cultivo inicial, como após o primeiro subcultivo, sendo realizado a cada 90 dias. No entanto, para outras espécies de orquídeas, a adição de biomassa de outras algas apresentou efeito positivo, aumentando área foliar ou massa fresca, variáveis que não foram avaliadas no presente estudo. Virág *et al.* (2011) recomendaram a adição de 0,5 g L⁻¹ de biomassa das cianobactérias *Nostoc* e de *Scotiella* sp por aumentar a área foliar e a massa fresca das plântulas, de *Phalaenopsis* sp. e a adição de 0,5 g L⁻¹ da biomassa *Scenedesmus* sp. e *Nostoc* que também aumentou a área foliar a massa fresca das plântulas de *Paphiopedilum* sp., após 90 dias. Um efeito positivo também foi observado para a germinação *ex vitro* de sementes de pepino, em placa de Petri

com papel filtro umedecido com 0,5 g L⁻¹ de biomassa de outra microalga (*Chlamydomonas*), em que ocorreu uma alta atividade estimulante de crescimento de raiz e de parte aérea em cotilédones de pepino, após sete dias da semeadura (PATIL *et al.*, 2015).

O alongamento das plântulas de *C. warneri* foi eficiente em meio contendo carvão ativado, pois esse meio proporcionou um aumento no comprimento da parte aérea (1,6 cm) e formação de raízes, com comprimento médio de 2,4 cm. A adição do carvão ativado no meio de cultura MSM/2 foi benéfica para acelerar o crescimento das plântulas, pois um dos seus efeitos é de adsorver substâncias inibidoras liberadas pelo meio ou pelos explantes promovendo maior alongamento e enraizamento (THOMAS, 2008), como foi constatado nesse estudo. A concentração ótima do carvão ativado varia entre as espécies, sendo que foi recomendada 1 g L⁻¹ para protocormos de *H. grandis* (VUDALA e RIBAS, 2017) e 3 g L⁻¹ para *Brasiliidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015), enquanto que no nosso estudo foi obtido resultado positivo com 2 g L⁻¹.

As plântulas desenvolvidas em meio MSM/2 contendo 0,5; 1 e 2 g L⁻¹ de extrato, quando cultivadas em meio de cultura dupla-fase apresentaram maior número médio de brotos (3,18) e consequentemente um menor alongamento. Essa resposta deve ter ocorrido devido à presença de zeatina na composição de extrato de *D. subspicatus* que estimulou a formação de novas plantas, pois um dos efeitos fisiológicos da zeatina é de induzir a formação de brotos em culturas (HAN *et al.*, 2018). Apesar da biomassa e do extrato da microalga suplementados no meio de cultura terem sido autoclavados, constatou-se que a citocinina não foi degradada, pois no extrato que continha concentração mais elevada de zeatina fornecida pelo meio dupla-fase ocorreu maior formação de brotos. Esse resultado foi observado também por Hart *et al.* (2016) que após autoclavar por um ciclo a citocinina trans-zeatina se manteve estável em meio MS. Isso pode ser uma grande vantagem para a produção de mudas de *C. warneri*, pois a zeatina é um regulador vegetal (citocinina) de custo muito elevado (1g – R\$ 27634,00). Outro fator que pode ter influenciado essa resposta positiva de aumento de plantas foi que ocorreu maior facilidade de absorção do extrato na fase líquida do meio dupla-fase. Segundo George *et al.* (2008), a utilização de meio líquido estacionário pode ocasionar falta de oxigenação ou hiperhidricidade, no entanto, isso não ocorreu com o meio dupla-fase de *C. warneri*, pois os brotos estavam parcialmente submersos no meio líquido.

Resultado positivo do meio dupla-fase, quando comparado com o meio semi-sólido também foi obtido para brotos de *Vanilla planifolia*, com a qual ocorreu um aumento de 2,5 vezes na taxa de multiplicação, com a adição de 4,4 μM de BAP na fase líquida (regulador vegetal sintético) (OLIVEIRA *et al.*, 2013). No presente estudo, ocorreu a formação de novas plantas, sem adição de regulador vegetal sintético, proporcionando uma redução de custo do protocolo de produção de mudas. Com adição de biomassa também ocorreu essa resposta de formação de novas plantas, entretanto, foi com menor frequência, pois a concentração detectada de zeatina (7,2 $\mu\text{g/g}$) foi mais baixa do que no extrato (45,8 $\mu\text{g/g}$). PEREIRA *et al.* (2018) não obtiveram resultado positivo da adição de microalga *Chlorella sorokiniana* na multiplicação *in vitro* de *Schomburgkia crispa*, sendo que o meio WPM suplementado com 22 μM de BAP apresentou melhor resposta de formação de brotos.

Na etapa de aclimatização, as plantas que foram transplantadas usando esfagno como substrato e pulverizadas com 0,5 e 2,0 g L^{-1} de biomassa apresentaram um aumento na parte aérea e massa fresca, e o número de folhas quando comparadas com as do controle e das concentrações de 1,0 e 2,0 g L^{-1} . Resultados positivos da ação bioestimulante também foram observados por Virág *et al.* (2011): após 90 dias, as mudas de *Phalaenopsis* e *Oncidium* pulverizadas com 0,1 e 0,2 g L^{-1} de biomassa da cianobactéria *Nostoc* tiveram aumento da área foliar e do número de folhas. O comprimento da maior raiz de *C. warneri* foi maior em plantas pulverizadas com 0,5 g L^{-1} de biomassa de *D. subspicatus*. Resultados semelhantes foram observados em estacas de *Petunia x hybrida* que após 42 dias de aplicações foliares com 10 g L^{-1} de biomassa da microalga *Scenedesmus* sp. obtiveram um maior desenvolvimento das folhas, crescimento de raiz e também um aumento de 24% no número de folhas em comparação com o controle (PLAZA *et al.*, 2018). Virág *et al.* (2011) constataram que pulverizações com 0,1 e 0,2 g L^{-1} de biomassa da cianobactéria *Nostoc* em plantas de *Paphiopedilum* não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle, para o número de raízes, número de folhas e área foliar, diferente do presente estudo em que as pulverizações com 0,5 e 2,0 g L^{-1} de biomassa provocaram um aumento nessas variáveis.

As plantas de *C. warneri* pulverizadas com 0,5 e 1,0 g L^{-1} de extrato de *D. subspicatus*, vindas do meio semi-sólido, com adição de carvão ativado

apresentaram um maior comprimento da parte aérea e massa fresca, enquanto que, as plantas pulverizadas com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato vindas do meio dupla fase eram menores e tinham menor massa fresca. Resultados semelhantes foram observados por Garcia-Gonzalez e Sommerfeld (2016) com mudas de tomate, pulverizadas com $3,75 \text{ g mL}^{-1}$ de extrato da microalga *Acutodesmus dimorphus*, nas quais ocorreu maior altura das plantas e massa fresca, enquanto que as mudas pulverizadas com concentrações mais altas ($5,62$ e $7,50 \text{ g mL}^{-1}$) eram menores e tinham menor massa fresca após quatro semanas. Resultado diferente foi obtido por Elarroussi *et al.* (2016) em plantas de tomate e pimenta pulverizadas com 3 g L^{-1} de extrato da microalga *Spirulina platensis*, as quais apresentaram aumento do tamanho e da massa fresca das plantas após 30 dias.

5 CONCLUSÕES

A adição de biomassa e de extrato da microalga *D. subspicatus* no meio MSM/2, apresentou um efeito positivo, pois acelerou a germinação inicial de *C. warneri* no período de 12 semanas. Com isso, recomenda-se a adição de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa ou extrato para a germinação e as concentrações mais altas de extrato ($1,0$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$) devem ser evitadas nessa etapa, pois apresentam efeito inibidor na germinação e desenvolvimento de plântulas. Estes resultados serviram de indicativo da ação bioestimulante da biomassa e do extrato de *D. subspicatus* sobre os estádios iniciais de desenvolvimento dos protocormos de *C. warneri*.

O alongamento e desenvolvimento de plântulas ocorreu em meio MSM/2, semi-sólido, suplementado com 2 g L^{-1} de carvão ativado. O meio dupla-fase (fina camada de meio líquido, contendo $0,5$; $1,0$ e 2 g L^{-1} de extrato) possibilitou um aumento do número de brotos e plântulas formadas, devido à presença de zeatina e outros compostos orgânicos na composição do extrato, sendo recomendada a concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ para aumentar a propagação de mudas de *C. warneri*.

As plantas foram aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação e devem ser realizadas pulverizações foliares com 2 g L^{-1} de biomassa ou 1 g L^{-1} de extrato de *D. subspicatus* por quatro meses. Os resultados contribuem para estudos futuros com o uso das microalgas no cultivo *in vitro* para acelerar a germinação de sementes de outras espécies de orquídeas e também como no uso de indução de novas brotações, pois ainda são escassos os estudos que relatam tal efeito.

6 REFERÊNCIAS

APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water**, 21^a ed, Washington: American Public Health Association, 2005.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CANCELA, Á.; MACEIRA, R.; ALFONSÍN, V.; SÁNCHEZ, Á. A study on techniques for microalgae separation and lipid extraction for *Desmodemus subspicatus* **International Journal of Environmental Research**, v.11, p. 387-394, 2017.

CNCFlora. *Cattleya warneri* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya warneri](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_warneri)>. Acesso em 31 maio 2020.

COLOMBO, R. C.; HOSHINO, R. T.; FERRARI, E. A. P.; ALVES, G. A. C.; FARIA R. T. *Cattleya forbesii* x *Cattleya bowringiana*: a new hybrid of *Cattleya* orchid. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 184-186, 2017.

CORBELLINI, J. R.; RIBAS, L. L. F.; MAIA F. R.; CORRÊA, D. O.; NOSEDA M. D.; SUZUKI, R. M.; AMANO E. Effect of microalgae *Messastrum gracile* and *Chlorella vulgaris* on the in vitro propagation of orchid *Cattleya labiata*, **Journal of Applied Phycology**, <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02251-9> 2020

CORRÊA, D. O.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Biomass production and harvesting of *Desmodemus subspicatus* cultivated in flat plate photobioreactor using chitosan as flocculant agent. **Journal of Applied Phycology**, <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1586-z>, 2018.

CORRÊA, D. O. **Extrato de microalgas como aditivo no meio de cultura para germinação assimbiótica in vitro e formação de plântulas de orquídeas**. Dissertação (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/34054>. Acesso em: 08 nov. 2020.

DEVI, N. P.; LISIPRIY, B.; BAI, N. Asymbiotic seed germination and mass multiplication of *Taprobanea spathulata* (L.) Christenson (Asparagales: Orchidaceae): a medicinally important epiphytic orchid. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 2, p. 271-286, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 3, p. 350–356, 1956.

ELARROUSSI, H.; ELMERNISSI, N.; BENHIMA, R.; EL KADMIRI, I. M.; BENDAOU, N.; SMOUNI, A.; WAHBY, I. Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 7, p. 55-63, 2016

FERREIRA, W. M.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators, **Iheringia, Série Botânica**, v. 72 p. 57-65, 2017.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*, **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 1051–1061, 2016

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; GEERT-JAN, K. **Plant propagation by tissue culture**, 3^{ed.}, v.1, The Background. Dordrecht: Springer, 2008.

GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.

HAN, X.; ZENG, H.; BARTOCCI, P.; FANTOZZI, F.; YAN, Y. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review. **Fermentation**, v. 4, p. 1-15, 2018.

HANNEN, E. V.; GODHE, P. F.; LURLING, M. A revised secondary structure model for the internal transcribed spacer 2 of the green algae *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and its implication for the phylogeny of these algae. **European Journal of Phycology**, v. 37, p. 203-208, 2002.

HART, D. S.; KEIGHTLEY, A.; SAPPINGTON, D.; NGUYEN, P. T. M.; CHRITTON, C.; SECKINGER, G. R.; TORRES, K. C. Stability of adenine-based cytokinins in aqueous solution. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 52, p. 1–9, 2016.

HENGLING, M. M.; GIANETI, T. M. R.; HOSOMI S. T.; MACHADO-NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Storage of Brazilian *Cattleya* seeds from diverse biomes: lipid composition and effects on germination, **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**. p 1-11, 2020.

HOSOMI, S. T.; SANTOS, R. B.; CUSTÓDIO, C. C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 139, p. 178-189, 2011.

KOENE, F. M.; AMANO, E.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 121 p. 83-91, 2019.

LONE, A. B.; BARBOSA, C. M.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. Aclimatização de *Cattleya* (Orchidaceae), em substratos alternativos ao xaxim e ao esfagno. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, p. 465-469, 2008.

MA, X.; LIU, J.; LIU, B.; CHEN, T.; YANG, B.; CHEN, F. Physiological and biochemical changes reveal stress-associated photosynthetic carbon partitioning into triacylglycerol in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis oculata*. **Algal Reserch**, v. 16, p. 28–35, 2016.

MERCADO, S. A. A.; CONTRERAS, N. A. V. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb.f. (Orchidaceae), **Acta Agronómica**, v. 66 p. 544-548, 2017

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

NAVARRO-LÓPEZ, E.; RUÍZ-NIETO, A.; FERREIRA, A.; ACIÉN, F. G.; GOUVEIA, L. Biostimulant potential of *Scenedesmus obliquus* grown in Brewery Wastewater, **Molecules**, v. 25 p. 3-16, 2020.

NICHOLS, H. W.; BOLD, H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. **Journal of Phycology**, v. 1, p. 34-38, 1965.

OLIVEIRA, S. O. D.; SAYD, R. M.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A new procedure for *in vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 204–209, 2013.

PATIL, K. J.; NANDRE, H.; MAHAJAN, R. T.; BANERJEE, C. SHUKLA, P.; BANDOPADHYAY, R. Plant growth stimulating activity of fresh water micro algae. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, p. 284-288, 2015.

PEREIRA, N. S.; FERREIRA, B. R. R.; CARVALHO, E. M.; DAMIANI, C. R. Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2347–2358, 2018.

PLAZA, B. M.; SERRANO, C. G.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; BECKER, S. J. Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus* sp.) on *Petunia x hybrida* growth, **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2359–2365, 2018.

PYATI, A. N. *In vitro* seed germination, protocorm formation and plantlet regeneration in *Aerides ringens* Fisher. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 29, p. 49-62, 2019.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

RONGA, D.; BIAZZI, E.; PARATI, K.; CARMINATI, D.; CARMINATI, E.; TAVA, A. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, v. 9, p. 2-22, 2019.

SASAMORI, M. H.; JÚNIOR, D. E.; DROSTE, A. Asymbiotic culture of *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae): the influence of macronutrient salts and sucrose concentrations on survival and development of plantlets, **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, p. 292-298. 2015.

SCHNEIDER, L.; ARAÚJO, J. S. P.; ZAFFARI, G. R. Seed germination of *Cattleya intermedia* and *Cattleya warneri* in alternative culture media. **American International Journal of Contemporary Research**, v. 4, n. 7; p. 60-66, 2014.

STIRK, W. A.; ÖRDÖG V.; NOVÁK, O.; ROLCIK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT, P.; STADEN, J. V. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v. 49, p. 459–467, 2013.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618–631, 2008.

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S. In vitro seed germination and seedling development of a rare indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm, **Scientifica-Hindawi**. <https://doi.org/10.1155/2019/8105138>, 2019

VIRÁG, E.; MOLNÁR, Z.; ÖRDOG, V. Application of algal biomass for enhanced acclimatization of orchids. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55 p. 179-181, 2011.

VUDALA, S. M.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **South African Journal of Botany**, v. 121 p.76-82, 2019.

YEUNG, E. C.; LI, Y. Y.; LEE, Y.I. Understanding seed and protocorm development in orchids. In: LEE, Y. I; YEUNG, E. C. (Eds.) **Orchid propagation: from laboratories to greenhouses – methods and protocols**, 2018

CAPÍTULO II

Efeito dos reguladores de crescimento vegetais, das poliaminas e da microalga *Desmodesmus subspicatus* na propagação *in vitro* de *Cattleya warneri* utilizando a técnica “thin cell layer” (TCL)

RESUMO

Cattleya warneri é uma orquídea com alto potencial ornamental pela beleza de suas flores e por apresentar coleta indiscriminada em seu habitat foi classificada como vulnerável, necessitando de estudos de propagação. A técnica “thin cell layer” (TCL) pode ser uma estratégia eficiente para a propagação massal dessa espécie. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos reguladores de crescimento vegetais (6-benzilaminopurina - BAP e ácido naftalenoacético - ANA) de poliaminas (PAs: putrescina - Put, espermidina - Spd e espermina - Spm) e de biomassa ou extrato aquoso da microalga verde *Desmodesmus subspicatus* na propagação *in vitro* de *C. warneri*, utilizando a técnica TCL. Protocormos de 90 e 120 dias obtidos da germinação *in vitro* em meio de cultura MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade (MSM/2) foram usados como explantes. Protocormos inteiros e secções transversais (TCLts) ou longitudinais (TCLls) foram cultivados em meio MSM/2 contendo BAP (0, 4, 8 ou 16 μM) e/ou ANA (0, 2 ou 4 μM); biomassa ou extrato de *D. subspicatus* (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g L^{-1}) e PAs (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mM). Posteriormente, os explantes foram cultivados em meio MSM/2 com 0, 1, 2 e 4 g L^{-1} de carvão ativado para induzir o alongamento e a formação de raízes. As plantas foram transplantadas em bandejas de semeadura utilizando diferentes substratos. Os resultados indicaram que os TCLts apicais foram os melhores explantes para regeneração de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) e os protocormos inteiros formaram plântulas. A regeneração de ESPs foi mais eficiente com adição de 8 μM de BAP (89% e 5,2 ESPs) e com 1,5 g L^{-1} de biomassa (92% e 4,7 ESPs) ou 1,0 g L^{-1} de extrato (100% e 3,3 ESPs) da microalga. A adição de biomassa (1,0 g L^{-1}) também possibilitou a regeneração de ESPs utilizando protocormos inteiros (70% e 4,0 ESPs). O meio contendo 3 g L^{-1} de carvão ativado é recomendado para o alongamento e desenvolvimento de raízes. A aclimatização das plantas foi eficiente independentemente do substrato utilizado (superior a 85% de sobrevivência). A adição de 1 g L^{-1} de biomassa ou 1,5 g L^{-1} de extrato de *D. subspicatus* no meio MSM/2 são alternativas eficazes para substituir os reguladores vegetais convencionais no meio de cultura. Foi estabelecido um protocolo rápido e eficiente para a propagação massal de plantas de *C. warneri* utilizando a técnica TCL.

Palavras-chave: Bioestimulante. Biomassa. Extrato. Micropropagação. Orchidaceae. Protocormo.

CHAPTER II

Effect of plant growth regulators, polyamines and microalgae of *Desmodesmus subspicatus* on *in vitro* propagation of *Cattleya warneri* using the thin cell layer (TCL) technique

ABSTRACT

Cattleya warneri, an orchid with high ornamental potential due to the beauty of its flowers, suffers the indiscriminate harvest in its habitat and is classified as vulnerable, requiring propagation studies. The thin cell layer (TCL) technique can be an efficient strategy for the mass propagation of this species. The aim of this study was to evaluate the effect of plant growth regulators (6-benzylaminopurine, BAP and naphthaleneacetic acid, NAA), polyamines (PAs: putrescine - Put, spermidine - Spd and spermine - Spm) and biomass or aqueous extract of *Desmodesmus subspicatus* green microalga on the *in vitro* propagation of *C. warneri* using the TCL technique. Protocorms of 90 and 120 days obtained from *in vitro* germination in MS culture medium with the concentration of macronutrients reduced by half (MSM/2), were used as explants. Entire protocorms and transversal sections (tTCLs) or longitudinal sections (ITCLs) were grown in MSM/2 medium containing BAP (0, 4, 8 or 16 μM) and / or NAA (0, 2 and 4 μM) as well as *D. subspicatus* biomass or extract (0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 g L^{-1}) and PAs (0, 0.25, 0.5, 1.0 and 1.5 mM). Subsequently, the explants were grown in MSM / 2 medium with 0, 1, 2 and 4 g L^{-1} of activated charcoal to induce elongation and root formation. The plants were transplanted into trays using different substrates. The results indicated that the apical TCLts were the best explants and the entire protocorms formed seedlings. The regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) was more efficient with the addition of 8 μM BAP (89% and 5.2 PLBs), and 1.5 g L^{-1} of microalgae biomass (92% and 4.7 PLBs) or 1.0 g L^{-1} of extract (100% and 3.3 PLBs). The use of biomass (1.0 g L^{-1}) also enabled PLB regeneration from entire protocorms (70% and 4.0 ESPs). Root elongation and development were obtained in a medium containing 3 g L^{-1} of activated charcoal. The plant acclimatization in several substrates was efficient (survival greater than 85%). The addition of 1 g L^{-1} of *D. subspicatus* biomass or 1.5 g L^{-1} of extract into MSM/2 medium is an effective alternative to replace conventional plant growth regulators. In conclusion, a rapid and efficient protocol for the mass propagation of *C. warneri* was achieved using the TCL technique.

Keywords: Biostimulant. Micropropagation. Biomassa. Extrato. Orchidaceae. Protocorm.

1 INTRODUÇÃO

Cattleya warneri é uma espécie epífita, que apresenta uma das maiores flores do gênero, muito visada como ornamental e com um alto valor de mercado (CNCFlora, 2012). Há muito tempo vem sofrendo grande extrativismo da natureza para fins lucrativos, além disso, tem como ameaça a destruição de seu habitat. Levando-se em conta sua distribuição restrita e seu habitat fragmentado, essa espécie foi classificada como “Vulnerável” (CNCFlora, 2012), necessitando de estudos de propagação. Um dos fatores que contribui para essa vulnerabilidade das orquídeas é que após a polinização, produzem cápsulas com numerosas sementes microscópicas, as quais não apresentam endosperma como tecido de reserva e dependem de fungos micorrízicos específicos para germinar. Sendo assim, a taxa de germinação na natureza é muito baixa, impedindo que as espécies se propaguem de maneira eficiente (GUPTA, 2016). Em função dessas características reprodutivas, a germinação assimbiótica e micropropagação de orquídeas vem sendo alternativas eficientes para produção de mudas (CARDOSO *et al.*, 2020).

Uma técnica muito eficaz para a propagação *in vitro*, que vem sendo utilizada nos últimos anos é a “thin cell layer” (TCL). Essa técnica apresenta vantagens, quando comparada com as de micropropagação convencional, pois possibilita uma maior superfície de contato dos tecidos com o meio de cultura e reduz o tempo para formar plantas (TEIXEIRA DA SILVA e DOBRÁNSZKI, 2014). Outro benefício dessa técnica é que a resposta ao estresse causada pelo ferimento pode induzir formação e diferenciação de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) (“protocorm-like bodies” - PLBs) permitindo a obtenção de elevadas taxas de multiplicação (TEIXEIRA DA SILVA e DOBRÁNSZKI, 2019). Segundo Cardoso *et al.* (2020), o processo de indução, multiplicação e regeneração de ESPs é um dos métodos mais vantajosos para a propagação massal de orquídeas. Com isso, a técnica TCL é uma alternativa promissora para espécies ameaçadas de extinção, como *C. warneri*.

Vários tipos de explantes podem ser utilizados com a técnica TCL, como: caules, folhas, flores e embriões (CHUGH *et al.*, 2009) e também os protocormos, estruturas características das orquídeas. Os protocormos são as primeiras estruturas a se formar após a germinação das sementes de orquídeas e estão entre os

explantes mais eficientes, pois a capacidade de divisão de suas células os torna explantes ideais para estudos de micropropagação (YEUNG, 2017).

Além da seleção do melhor explante, essa técnica depende da escolha de um meio de cultura adequado e da adição de reguladores do crescimento vegetais. Várias formulações de meios de cultura vêm sendo utilizadas com a técnica TCL, para espécies de *Cattleya*, como por exemplo: KNUDSON (1946) para *Cattleya forbesii* (EKMEKÇİGİL *et al.*, 2019) e MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com suas modificações para *Cattleya labiata* (CORBELLINI *et al.*, 2020). Os reguladores vegetais mais utilizados para indução e multiplicação de ESPs são: citocininas, isoladas ou combinadas com auxinas, como por exemplo: benzilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido α -naftalenoacético (ANA) e as concentrações variam conforme a espécie (CARDOSO *et al.*, 2020; PAEK *et al.*, 2011). Uma alternativa, para reduzir os custos e melhorar a eficiência de protocolos de micropropagação é testar a adição de compostos bioestimulantes, como substitutos parciais ou totais dos reguladores vegetais. Bioestimulantes são produtos que, aplicados em pequenas quantidades, estimulam o crescimento e desenvolvimento de muitas culturas, tanto em condições ótimas, como também de estresse (RONGA *et al.*, 2019). Stirk *et al.* (2013) identificaram a presença de auxinas, citocininas, giberelinas e brassinosteróides em cepas de microalgas, sendo que esses hormônios são fundamentais para estimular o desenvolvimento de plantas. Estudos com uso de microalgas no cultivo *in vitro* são escassos. Corbellini *et al.* (2020) constataram que a adição de microalgas da família Chlorophyceae no meio de cultura foi eficiente para indução e regeneração de ESPs de *C. labiata* e que esses bioestimulantes podem substituir o uso de reguladores vegetais convencionais. Resultados preliminares com extrato da microalga *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E. Hegewald & A. W. F. Schmidt (Scenedesmaceae) apresentaram um efeito positivo na germinação assimbiótica de *C. warneri*, sendo necessários estudos para verificar a sua eficiência com a técnica TCL.

Outros aditivos que podem ser utilizados no cultivo *in vitro* são as poliaminas (PAs), que são compostos polications orgânicos, constituídos de dois ou mais grupos aminos, utilizados para melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas, devido aos seus efeitos na divisão e diferenciação celular (ABBASI *et al.*, 2017). As principais PAs presentes nas plantas superiores são: espermidina (Spd), espermina (Spm) e putrescina (Put) (ABBASI *et al.*, 2017). Essas PAs vêm sendo

testadas na organogênese, por apresentarem efeitos na divisão e alongamento celular, enraizamento e na formação adventícia de brotos (CHEN *et al.*, 2019). A adição de PAs nos meios de cultura, associada ou não com citocininas e/ou outros reguladores vegetais também têm demonstrado efeito positivo em várias etapas da micropropagação de orquídeas, inclusive utilizando a técnica TCL (BHATTACHARYYA *et al.*, 2016; MANDAL *et al.*, 2020).

As ESPs regeneradas são cultivadas em meio de cultura, sem adição de reguladores de crescimento vegetais e/ou com adição de carvão ativado para estimular o alongamento e desenvolvimento de raízes. O carvão ativado foi eficiente para promover o alongamento e desenvolvimento de raízes de orquídeas, como: *Brasiliidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015), *Hadrolaelia grandis* (VUDALA *et al.*, 2019) e de *C. labiata* (CORBELLINI *et al.*, 2020).

A última etapa da micropropagação é a de transplântio e aclimatização de mudas, sendo necessários cuidados especiais para obtenção de elevadas porcentagens de sobrevivência. Um dos fatores que interfere nessa etapa é a escolha de um substrato adequado para o transplântio. Vários substratos podem ser utilizados, como por exemplo, xaxim desfibrado, fibra de coco, pó de coco, casca de pinus e esfagno (ZANDONA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016; WATTANAPAN *et al.*, 2018). Para orquídeas do gênero *Cattleya* vêm sendo indicada fibra de coco, casca de pinus e esfagno (COLOMBO *et al.*, 2017; MERCADO e CONTRERAS, 2017 e VETTORAZZI *et al.*, 2019).

Não existem estudos testando a eficiência da adição de extrato ou biomassa da microalga *D. subspicatus* ou de PAs como substitutos da adição de reguladores vegetais na micropropagação de *C. warneri*. Com isso, o objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo de propagação massal de mudas de *C. warneri* utilizando a técnica TCL, a partir de protocormos. Os efeitos do tipo de secção, da adição e concentração de reguladores vegetais, de poliaminas e de extrato aquoso ou de biomassa da microalga *D. subspicatus* foram testados para obtenção de maiores taxas de regeneração de ESPs na tentativa de reduzir os custos e acelerar a produção de mudas em grande escala de *C. warneri*.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos de micropropagação foram realizados no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O cultivo da microalga *D. subspicatus*, o preparo do extrato aquoso e da biomassa, a caracterização bioquímica dos mesmos e a quantificação dos reguladores vegetais foram realizados no Laboratório de Aplicações Biotecnológicas de MicroAlgas (LABMA), da UFPR.

2.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO AQUOSA

A espécie *D. subspicatus* foi obtida da coleção de cultura de microalgas de Elizabeth Aider da Universidade Federal Fluminense. As microalgas foram cultivadas em um fotobiorreator de placa plana com volume útil de 100 L durante 14 dias em sala climatizada (23 ± 1 °C), em regime fotoautotrófico com iluminação contínua e intensidade luminosa de $155 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ usando meio de cultivo BBM (NICHOLS e BOLD, 1965). Foram determinados parâmetros de crescimento como a biomassa seca (APHA, 2005), densidade celular por microscopia óptica e variações do pH. A biomassa produzida foi recuperada por floculação utilizando quitosana como agente floculante, seguindo metodologia descrita por Corrêa *et al.* (2018) que permite concentrar a biomassa em até 5% do volume de cultivo original. Após a floculação, o concentrado foi separado do meio de cultivo residual por centrifugação à 2600 *g* por 20 minutos a 4 °C, seguido de congelamento e liofilização.

A biomassa seca foi submetida à extração aquosa em água ultrapura a 10% (m/v), em agitação à temperatura ambiente por 1 h. Após a extração, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante (extrato aquoso) foi reservado e o precipitado (biomassa residual) suspenso novamente em igual volume de água para repetição do procedimento, a fim de maximizar a eficiência de extração. Após a segunda etapa de extração, os dois volumes de extrato aquoso foram reunidos e secos por liofilização, com a finalidade de determinar o rendimento do processo e evitar a degradação de moléculas termolábeis. Os extratos obtidos por esse processo foram

utilizados para determinação de sua composição bioquímica e avaliação da atividade bioestimulante em bioensaios com *C. warneri*.

2.3 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E EXTRATO MICROALGAIS

A biomassa liofilizada (20 mg) foi submetida à hidrólise ácida com 1 mL de H₂SO₄ (80%, v/v) a temperatura ambiente por 20 h, seguido de adição de 9 mL de água e centrifugação para 8500 g por 5 min. O sobrenadante (1 mL) foi utilizado para determinação dos carboidratos totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As proteínas foram determinadas pelo método colorimétrico de Bradford (1976), com hidrólise alcalina prévia da biomassa liofilizada utilizando NaOH 1 M, de acordo com metodologia descrita por Ma *et al.* (2016). Lipídios totais foram extraídos usando uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), seguindo metodologia gravimétrica descrita por Bligh e Dyer (1959).

Os fitormônios presentes no extrato aquoso (1 mg mL⁻¹ em acetonitrila) foram determinados por HPLC-MS, usando padrões analíticos de auxinas (ácido 3-indol-acético - AIA) , citocininas (N6-benziladenina - BA; N6-benziladenosina - BAR; di-hidrozeatina - DZ; N6-isopenteniladenina - iP; cinetina - K; cinetina ribosídeo - KR; trans-zeatina - Z; trans-zeatina ribosídeo - ZR), giberelina (ácido giberélico - GA₃) e do ácido abscísico (ABA) (OChemIm Ltd, Olomouc, Czech-Republic) para referência e comparação dos tempos de retenção. Ácido fórmico (85%, v/v), acetonitrila (99,9%, v/v) e água ultrapura foram utilizados para compor a fase móvel, que consistia de dois solventes: (A) acetonitrila e ácido fórmico (0,1%, v/v); (B) água ultrapura e ácido fórmico (0,01%, v/v). A análise foi realizada em um HPLC Shimadzu LC10-A (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com coluna cromatográfica Ascentis® C18 (15 cm x 2,1 mm, 3 µm), acoplado a espectrômetro de massas Bruker MicrOTOF-Q II XL (Bruker, Billerica, USA), com fonte de ionização por eletrodispersão (eletrospray – 100 eV) e gás nebulizador nitrogênio (4 Bar, 200 °C), utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: volume de injeção (10 µL); fluxo (0,4 L min⁻¹); temperatura (40 °C) e fase móvel com gradiente de solventes A e B (0 min – 3%:97%; 8 min – 30%:70%; 10 min – 50%:50%; 14 min – 80%:20%; 20 min).

2.4 MATERIAL VEGETAL

Sementes de quatro cápsulas, obtidas de polinização cruzada de indivíduos diferentes de *C. warneri* (FIGURA 5A) foram coletadas no Instituto de Botânica de São Paulo e armazenadas em refrigerador (4 °C) por 14 meses.

2.5 TESTE DO TETRAZÓLIO (TZ)

O teste TZ foi realizado com a utilização três amostras de sementes (12 mg), as quais foram pré-condicionadas em solução de sacarose a 10% por 24 h. Após este período, as sementes foram transferidas para a solução neutra de tetrazólio 1%, mantidas por 24 h em banho-maria à temperatura constante de 38 °C e na ausência de luz. Em seguida, alíquotas de cada amostra foram colocadas em lâminas de vidro com fundo azul e avaliadas em microscópio estereoscópico (modelo SMZ-171, Motic). Foram realizadas contagens para verificar a porcentagem de sementes viáveis (embrião com coloração vermelha), inviáveis (embrião com coloração branca) e palha (sem embrião), conforme a metodologia descrita por HOSOMI *et al.* (2011). As sementes foram fotografadas em microscópio estereoscópico Leica MZ16 (câmera Leica DFC500). Após a avaliação da viabilidade, as sementes utilizadas foram descartadas.

2.6 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Foram pesadas 40 mg de sementes de quatro cápsulas e desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% (v/v), acrescida de 0,1% de Tween 20®, durante 10 minutos e em agitação. Em seguida, as sementes com a solução desinfestante, foram transferidas para um funil de vidro revestido com papel filtro esterilizado, onde foram realizadas seis lavagens com água destilada autoclavada. Após a secagem das sementes no papel filtro, com auxílio de uma espátula foram semeadas em placas de Petri, contendo meio de cultura MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade (MSM/2). Em cada placa de Petri continha aproximadamente 400 sementes e 16 repetições. A germinação *in vitro* foi realizada para a obtenção dos protocormos de 90 e 120 dias para os experimentos de TCL com reguladores vegetais e com PAs.

Paralelamente foi realizada germinação em meio MSM/2, suplementado com: 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de biomassa ou de extrato aquoso da microalga *D. subspicatus*. Cada tratamento foi constituído de oito repetições. Essa germinação foi realizada para obtenção de protocormos de 90 dias de idade que foram utilizados em experimento de TCL.

2.7 “THIN CELL LAYER”

Protocormos com ápices e rizóides, com espessura de aproximadamente 2 mm, obtidos após 90 e 120 dias da germinação em meio de cultura MSM/2 foram utilizados como fonte de explantes (FIGURA 5B). Foram testados protocormos inteiros (2 mm de espessura) e seccionados em duas secções transversais (TCLt apical e TCLt basal) e duas secções longitudinais (TCLl) de 0,5 a 1 mm de espessura. As secções de TCL foram inoculadas com a região de corte em contato com o meio de cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo que em cada placa de Petri foram cultivados: oito protocormos inteiros, oito TCLts de cada região (apical e basal) e oito TCLls, com oito repetições, totalizando 32 explantes por placa.

2.7.1 Efeito de reguladores do crescimento vegetais e poliaminas (PAs) na regeneração de ESPs

Os explantes de 90 dias de idade foram inoculados em placas de Petri com 40 ml de meio de cultura MSM/2, suplementado com 0, 4, 8 e 16 µM de BAP e 0, 2 e 4 µM de ANA e com combinações de BAP e ANA, totalizando 12 tratamentos.

Explantes de 120 dias de idade foram inoculados em meio de cultura MSM/2, suplementado com as PAs: Put, Spm e Spd, nas concentrações: 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mM e um controle (sem adição de PA). As PAs foram esterilizadas utilizando filtro de 0,22 µm, antes de serem adicionadas no meio de cultura.

2.7.2 Efeito da biomassa ou extrato aquoso de microalga na regeneração de ESPs

Explantos com 90 dias obtidos da germinação *in vitro*: protocormos inteiros (2 mm de espessura), TCLts apicais, TCLts basais e TCLIs (1 mm de espessura) foram inoculados em meio de cultura MSM/2, suplementado com: 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹ de biomassa ou de extrato aquoso da microalga *D. subspicatus*.

2.7.3 Subcultivos e avaliação dos experimentos com TCL

Os explantes dos experimentos com reguladores vegetais, PAs e biomassas ou extratos de microalgas foram avaliados no cultivo inicial e subcultivados para os mesmos tratamentos, por dois subcultivos sucessivos a cada 90 dias. A avaliação foi realizada após os dois subcultivos, considerando as seguintes variáveis: porcentagem de explantes que regeneraram ESPs, número médio de ESPs por explante, porcentagem de enraizamento, número médio de raízes e porcentagem de formação de plântulas para os protocormos inteiros.

2.8 ALONGAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES

Os explantes obtidos dos TCLs dos experimentos com reguladores de crescimento vegetais, PAs e microalgas, medindo aproximadamente 0,5 cm de comprimento, foram inoculados em frascos contendo meio de cultura MSM/2, acrescido de 0, 1, 2 e 4 g L⁻¹ de carvão ativado. Foram inoculados seis ESPs por frasco e quatro repetições, totalizando 24 ESPs por tratamento. Após 120 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio da maior raiz, comprimento médio da parte aérea e massa fresca.

2.9 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO

Após 120 dias de cultivo em meio MSM/2, contendo carvão ativado, as plantas, com no mínimo 2 cm de comprimento, foram individualizadas, as suas raízes lavadas e plantadas em bandejas de semeadura contendo 128 células (52 cm

x 26 cm), cada célula com 4,5 x 4,5 cm², contendo diferentes substratos (0,5 g por célula).

As plantas vindas do experimento de TCL com reguladores vegetais foram plantadas nos seguintes substratos: 1- esfagno, 2- vermiculita de granulometria fina Eucatex®, 3- esfagno e casca de pinus na proporção 1:1 (v/v) e 4- casca de pinus, carvão vegetal e fibra de coco na proporção 1:1:1 (v/v). Cada tratamento foi constituído de oito plantas e 20 repetições.

As plantas vindas do experimento de TCL com PAs foram plantadas nos seguintes substratos: 1- esfagno, 2- vermiculita de granulometria fina Eucatex®, 3- esfagno e casca de pinus na proporção 1:1 (v/v), 4- casca de pinus, carvão vegetal e fibra de coco na proporção 1:1:1 (v/v), 5- vermiculita e casca de pinus na proporção 1:1 (v/v) e 6- vermiculita e fibra de coco na proporção 1:1 (v/v). Cada tratamento foi constituído de oito plantas com 10 repetições.

As plantas vindas do experimento de TCL com biomassa ou extrato de *D. subspicatus* foram plantadas nos substratos: 1- esfagno, 2- mistura comercial Maxfertil® constituída de casca de pinus, casca de arroz, vermiculita e NPK, 3- esfagno e casca de pinus na proporção 1:1 (v/v) e 4- mistura comercial Forth® constituída de casca de pinus decomposta e cinzas. Cada tratamento foi constituído de oito plantas com 20 repetições.

Para todos os experimentos de transplântio foram avaliadas as porcentagens de sobrevivência, após 90 e 120 dias.

2.10 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado foi o MSM/2, suplementado com 5,4 g L⁻¹ de ágar Vetec® e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 1N, antes da adição do ágar. Os meios foram esterilizados à temperatura de 121°C, durante 20 minutos.

Os experimentos de germinação *in vitro* e de TCL (com adição de reguladores do crescimento vegetais, PAs e de biomassa ou extrato da microalga *D. subspicatus*) foram realizados em placas de Petri (10 x 150 mm), contendo 40 ml do meio de cultura.

Para a etapa de alongamento e desenvolvimento de raízes, os explantes foram colocados em frascos de vidro de capacidade de 100 ml (65 x 80 mm)

contendo 40 ml de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno. As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 22 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $73 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (germinação *in vitro*) e $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (alongamento e desenvolvimento de raízes).

As mudas transplantadas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura média de $19 \pm 3^\circ \text{C}$, mínima de $14 \pm 3^\circ \text{C}$ e máxima de $22 \pm 3^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 12 horas e com iluminação artificial de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas de vapor de mercúrio.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos de TCL, do alongamento e de aclimatização de mudas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando-se a linguagem de programação Julia, na qual as funções para a análise dos dados e representação gráfica foram desenvolvidas por Alexandre Behling e colaboradores (2020). Os dados foram transformados quando necessário. A análise de regressão foi utilizada para os dados dos experimentos de TCL com microalgas e também na etapa de alongamento e enraizamento.

3 RESULTADOS

3.1 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA E EXTRATO DA MICROALGA

A caracterização da composição bioquímica da biomassa e extrato aquoso da microalga *D. subspicatus* indicou a presença de zeatina, carboidratos, proteínas e cinzas (TABELA 1). As concentrações dos componentes apresentaram pequenas variações, com maiores valores obtidos para biomassa seca e os lipídios só foram identificados na biomassa seca (TABELA 1). O único hormônio detectado na análise foi a trans-zeatina - Z, sendo que os demais analisados: auxina, giberelina e ácido abscísico encontravam-se ausentes ou abaixo do limite de detecção. A concentração da zeatina foi aproximadamente seis vezes maior no extrato, quando comparada com a da biomassa seca (TABELA 1).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA SECA E EXTRATO AQUOSO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.

Composição*	Biomassa seca	Extrato aquoso
Carboidratos (mg g ⁻¹)	312,4 ± 6,8	227,1 ± 4,3
Proteínas (mg g ⁻¹)	213,6 ± 3,5	164,5 ± 3,8
Lipídios (mg g ⁻¹)	142,1 ± 5,2	Nd
Cinzas (mg g ⁻¹)	209,8 ± 4,1	217,5 ± 6,2
Zeatina (µg g ⁻¹)	7,2 ± 0,8	45,8 ± 1,8

*dados (médias ± desvios padrões, n=3); nd – não detectado.

FONTE: A autora (2020).

3.2 TESTE DE VIABILIDADE DO TETRAZÓLIO (TZ) E GERMINAÇÃO *IN VITRO*

O resultado do teste TZ indicou 94,3% de sementes viáveis, 1,9% de sementes inviáveis e 3,8% sem embrião, após 14 meses de armazenamento em temperatura de 4°C.

A germinação *in vitro* foi eficiente em meio de cultura MSM/2, sendo que após 90 dias foram obtidos protocormos com ápice e rizóides (FIGURA 1B) para os experimentos com reguladores do crescimento vegetais e biomassa ou extrato de *D. subspicatus* e 120 dias para o de PAs.

3.3 “THIN CELL LAYER”

3.3.1 Efeito dos reguladores do crescimento vegetais (BAP e/ou ANA) na regeneração de ESPs

A análise de variância indicou que foi significativa a interação entre o tipo de explante e o regulador vegetal para as variáveis: porcentagem de explantes que regeneraram ESPs, número médio de ESPs e porcentagem de enraizamento. Para o número médio de raízes, o tipo de explante utilizado teve efeito significativo e para os protocormos inteiros que formaram plântulas houve diferença significativa entre os tratamentos com reguladores do crescimento vegetais, após 90 dias do segundo subcultivo (ANEXO 1).

Os protocormos inteiros apresentaram baixas porcentagens de explantes que regeneraram ESPs, não havendo diferença entre os reguladores vegetais testados (TABELA 2, Teste de Tukey, $P \geq 0,05$). Os TCLs apicais foram os explantes mais responsivos e a adição de reguladores do crescimento vegetais também não

influenciou as respostas de regeneração de ESPs. No entanto, para os TCLs basais e longitudinais as maiores porcentagens de regeneração de ESPs ocorreram com a adição de 8 μ M de BAP no meio de cultura MSM/2 (68,75% e 87,50% respectivamente), diferindo significativamente dos outros tratamentos com reguladores do crescimento vegetais (TABELA 2, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). De uma maneira geral, as respostas de porcentagem de regeneração de ESPs, foram superiores com os TCLs apicais, seguidos dos longitudinais, dos protocormos inteiros e basais (TABELA 2).

O número médio de ESPs não sofreu influência da adição do regulador de crescimento vegetal, tanto para os protocormos inteiros, como também para os TCLs testados (TABELA 2, Teste de Tukey, $P \geq 0,05$). Com a adição de BAP e ANA isolados e combinados, os TCLs apresentaram maiores números de ESPs do que com os protocormos inteiros. As melhores respostas foram obtidas com TCLts apicais, TCLIs e TCLts basais, respectivamente, na maioria dos tratamentos com adição de reguladores isolados ou combinados (TABELA 2).

Para a variável porcentagem de enraizamento, os protocormos inteiros e apicais não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos com reguladores vegetais, enquanto que com a adição de 8 μ M de BAP ocorreu a maior porcentagem de enraizamento (83,33%) nos TCLIs e nos TCLts basais (60,42%) (TABELA 2, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). De maneira geral, os protocormos inteiros foram os que apresentaram mais altas porcentagens de enraizamento, seguido dos TCLts apicais, TCLIs e os TCLts basais foram os explantes com as mais baixas porcentagens (TABELA 2).

Os protocormos inteiros cultivados em meio contendo 4 μ M de ANA apresentaram a maior porcentagem de formação de plântulas (95,83%), sendo significativamente superior à obtida com 8 e 16 μ M de BAP e com as combinações de BAP e ANA (4 e 8 μ M de BAP e 4 μ M de ANA e 8 μ M de BAP e 2 μ M de ANA) (TABELA 3, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

O tipo de explante apresentou influência significativa para o número médio de raízes, sendo maior nos TCLIs e nos TCLts apicais, quando comparados com o dos TCLts basais e protocormos inteiros (TABELA 3, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

A análise conjunta das variáveis porcentagem e número médio de ESPs indicou que devem ser utilizados TCLts apicais (89,58% e 5,2 ESPs) ou longitudinais (87,50% e 4,8 ESPs) em meio de cultura MSM/2, contendo 8 μ M de BAP (FIGURA

5C). Os protocormos inteiros apresentaram as maiores porcentagens de formação de plântulas não sendo necessário adicionar reguladores vegetais.

TABELA 2 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO BAP E ANA.

BAP e ANA (µM)	Explantes que regeneraram ESPs (%)				Número médio de ESPs				Enraizamento (%)			
	Protocormos inteiros	TCLts apicais	TCLts Basais	TCLIs	Protocormos inteiros	TCLts apicais	TCLts basais	TCLIs	Protocormos inteiros	TCLts Apicais	TCLts basais	TCLIs
Controle	4,16 a C	68,75 a A	4,17 b C	45,83 b B	2,0 a A	2,4 a A	1,0 a A	2,0 a A	91,67 a A	68,75 a B	4,17 b D	45,83 b C
4 + 0	14,58 a B	66,67 a A	4,17 b B	29,17 b B	1,4 a A	3,4 a A	5,5 a A	3,5 a A	85,42 a A	60,42 a B	4,17 b C	22,92 b C
8 + 0	47,92 a C	89,58 a A	68,75 a B	87,50 a A	1,9 a B	5,2 a A	6,0 a A	4,8 a A	52,08 a B	89,58 a A	60,42 a B	83,33 a A
16 + 0	45,83 a B	66,67 a A	16,67 b C	41,67 b B	1,5 a B	6,9 a A	5,6 a A	4,9 a A	52,08 a A	54,17 a A	12,50 b B	31,25 b B
0 + 2	10,42 a C	70,83 a A	4,17 b C	45,83 b B	3,4 a A	3,2 a A	3,5 a A	3,1 a A	93,75 a A	68,75 a B	4,17 b D	41,67 b C
0 + 4	4,17 a C	72,92 a A	4,17 b C	50,00 b B	4,5 a A	4,6 a A	3,5 a A	3,2 a A	100,00 a A	72,92 a B	4,13 b D	50,00 b C
4 + 2	20,83 a B	52,08 a A	8,33 b B	27,08 b B	2,6 a B	3,9 a B	6,7 a A	3,3 a B	79,17 a A	52,08 a B	8,33 b C	25,00 b C
4 + 4	25,00 a B	58,33 a A	6,25 b C	35,42 b B	2,1 a B	5,2 a A	5,7 a A	4,4 a A	75,00 a A	50,00 a B	6,25 b C	35,42 b B
8 + 2	43,75 a B	81,25 a A	4,17 b C	43,75 b B	2,2 a B	6,5 a A	2,0 a B	3,9 a B	56,25 a A	68,75 a A	2,08 b B	39,58 b A
8 + 4	43,75 a B	66,67 a A	0,00 b D	20,83 b C	2,3 a B	6,7 a A	0,0 a C	6,9 a A	70,83 a A	62,50 a A	0,00 b B	18,75 b B
16 + 2	45,83 a A	56,25 a A	4,17 b B	60,42 b A	1,9 a B	5,3 a A	5,0 a A	4,9 a A	54,17 a A	39,58 a A	0,00 b B	33,33 b A
16 + 4	29,17 a B	70,83 a A	6,25 b C	39,58 b B	1,7 a B	6,2 a A	4,3 a A	5,9 a A	72,92 a A	70,83 a A	4,17 b C	35,42 b B

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade;

BAP= 6-benzilaminopurina; ANA= ácido naftalenoacético;

TCLts = “thin cell layer” transversais TCLIs = “thin cell layer” longitudinais

Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey. P >0,05.

FONTE: A Autora (2020).

TABELA 3 – RESPOSTAS DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS EM PROTOCORMOS INTEIROS E DO NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO BAP E ANA.

BAP+ ANA (µM)	Formação de Plântulas (%)	Tipo de explante	Nº médio de raízes
0+0	87,50 a b	Protocormos inteiros	1,9 b
4 + 0	81,25 a b c	TCLts apicais	3,8 a
8 + 0	41,67 d	TCLts basais	1,7 b
16 + 0	50,00 c d	TCLIs	4,0 a
0 + 2	87,50 a b		
0 + 4	95,83 a		
4 + 2	68,75 a b c d		
4 + 4	64,58 b c d		
8 + 2	47,92 d		
8 + 4	52,08 c d		
16 + 2	45,83 c d		

MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade;

BAP= 6-benzilaminopurina; ANA= ácido naftalenoacético;

TCLts = “thin cell layer” transversais TCLIs = “thin cell layer” longitudinais

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente, pelo Teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

FONTE: A autora (2020).

3.3.2 Efeitos das PAs na regeneração de ESPs

A avaliação da análise de variância indicou que o tipo de explante e a concentração de Put tiveram influência significativa para a variável porcentagem de explantes que regeneraram ESPs. A interação do tipo de explante e a concentração de Put foi significativa para o número médio de ESPs. O tipo de explante teve influência significativa para porcentagem de enraizamento e número médio de raízes. Para os protocormos inteiros não houve diferença entre os tratamentos para a porcentagem de formação de plântulas, após 90 dias do segundo subcultivo (ANEXO 2).

Os TCLts apicais apresentaram melhores respostas de regeneração de ESPs (85,42%), seguido dos TCLIs, TCLts basais e dos protocormos inteiros, com apenas 5% (TABELA 4, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). A adição 0,25 mM de Put no meio MSM/2 proporcionou a mais baixa porcentagem de regeneração de ESPs (30,73%) diferindo significativamente dos outros tratamentos (TABELA 4, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

TABELA - 4 RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs, EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO PUTRESCINA.

Tratamentos		Explantos que regeneraram ESPs (%)	
Putrescina (mM)			
0	40,10 a	tipo de explante	
0,25	30,73 b	Protocormos inteiros	5,00 d
0,5	42,19 a	TCLts apicais	85,42 a
1,0	42,19 a	TCLts basais	12,08 c
1,5	40,10 a	TCLIs	53,75 b

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = meio MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade.

TCLts = "thin cell layer" transversais TCLIs = "thin cell layer" longitudinais

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente, pelo Teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

FONTE: A autora (2020).

O número de médio de ESPs não diferiu entre os tipos de explantes e as concentrações de Put tiveram influência somente para os TCLts basais, com melhor resposta (4,3) obtida com adição de 0,5 mM ao meio MSM/2, quando comparada com as outras concentrações (TABELA 5, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

O tipo de explante apresentou diferença significativa para as porcentagens de enraizamento, com melhores respostas para os protocormos inteiros, seguido dos TCLts apicais, TCLIs e TCLts basais (TABELA 6, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). No entanto, o número médio de raízes foi mais baixo para os protocormos inteiros, quando comparados com os TCLs (TABELA 6, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Os protocormos inteiros também formaram elevadas porcentagens de formação de plântulas, independente da concentração de Put (TABELA 5).

A análise conjunta das variáveis indicou utilizar TCLts apicais, não sendo necessária a adição de Put para a regeneração de ESPs. Os protocormos inteiros formaram plântulas, independente da adição de Put (FIGURA 5D).

TABELA 5 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO PUTRESCINA.

Putrescina (mM)	Número médio de ESPs				Formação de Plântulas (%)
	Protocormos Inteiros	TCLts Apicais	TCLts Basais	TCLIs	Protocormos inteiros
0	3,0 a A	1,9 a A	1,7 b A	2,2 a A	95,83 a
0,25	2,0 a A	3,0 a A	2,0 b A	2,7 a A	97,92 a
0,5	4,0 a A	2,3 a A	4,3 a A	2,7 a A	95,83 a
1,0	3,8 a A	2,6 a A	1,7 b A	3,5 a A	87,50 a
1,5	3,0 a A	2,8 a A	2,5 b A	3,3 a A	93,75 a

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade.

TCLts = "thin cell layer" transversais TCLIs = "thin cell layer" longitudinais

Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey. $P > 0,05$. FONTE: A autora (2020).

TABELA 6 - RESPOSTAS DO TIPO DE EXPLANTE NO ENRAIZAMENTO DE ESPs DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO PUTRESCINA.

Explante	Enraizamento (%)	Número médio de raízes
Protocormos inteiros	98,75 a	2,0 b
TCLts apicais	82,50 b	2,8 a
TCLts basais	9,58 d	3,2 a
TCLIs	52,50 c	3,3 a

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade.

TCLts = "thin cell layer" transversais TCLIs = "thin cell layer" longitudinais

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente, pelo Teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

FONTE: A autora (2020).

A análise de variância do experimento com adição de Spm indicou que o tipo de explante teve efeito significativo para as variáveis: porcentagem de explantes que regeneraram ESPs, número médio de ESPs e porcentagem de enraizamento. Para a variável número médio de raízes houve interação significativa entre tipo de explante e concentração de Spm. Para os protocormos inteiros não houve diferença significativa entre os tratamentos para formação de plântulas, após 90 dias do segundo subcultivo (ANEXO 3).

Os explantes que apresentaram elevadas porcentagens de regeneração de ESPs foram os TCLts apicais (88,33%), seguido dos TCLIs (57,50%), sendo que os TCLts basais e os protocormos inteiros obtiveram as mais baixas porcentagens (12,08% e 5,83%, respectivamente) (TABELA 7, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). O menor número médio de ESPs, ocorreu com os TCLts basais, quando comparados com os outros tipos de explantes (TABELA 7, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$)

A porcentagem de enraizamento apresentou diferença significativa entre os tipos de explantes, sendo maior para os protocormos inteiros, seguida dos TCLts apicais, TCLIs e TCLts basais (TABELA 7, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

TABELA - 7 RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMINA.

Explante	Explante que regeneraram ESPs (%)	Número médio de ESPs	Enraizamento (%)
Protocormos inteiros	5,83 c	2,6 a	99,17 a
TCLts apicais	88,33 a	2,4 a	87,50 b
TCLts basais	12,08 c	1,7 b	7,50 d
TCLIs	57,50 b	2,6 a	56,25 c

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos;

MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade.

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente, pelo Teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

TCLts = "thin cell layer" transversais TCLIs = "thin cell layer" longitudinais

FONTE: A autora (2020).

O número médio de raízes foi mais baixo em TCLts basais com adição de 0,5 mM de Spm e em protocormos inteiros com 1 mM de Spm (TABELA 8, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). As concentrações de Spm só influenciaram os TCLts basais, com o maior número médio de raízes (4,8), com adição de 1,0 mM ao meio MSM/2 (TABELA 8, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Os protocormos inteiros apresentaram elevadas porcentagens de formação de plântulas (acima de 83,33%), independente da adição de Spm (TABELA 8, Teste de Tukey, $P > 0,05$).

A análise conjunta das variáveis indicou que para maior regeneração de ESPs recomenda-se utilizar TCLts apicais, sem adição de Spm (FIGURA 5E). Da mesma forma que para a Put, os protocormos inteiros formaram as maiores porcentagens de plântulas.

TABELA - 8 RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMINA.

Tratamentos	Número médio de raízes				Formação de Plântulas (%)
	Protocormos inteiros	TCLts apicais	TCLts basais	TCLIs	Protocormos inteiros
Espermina (mM)					
0	2,0 a A	2,9 a A	3,0 b A	3,1 a A	95,83 a
0,25	1,9 a A	2,9 a A	2,4 b A	2,9 a A	95,83 a
0,5	2,3 a A	2,4 a A	0,0 c B	3,1 a A	83,33 a
1,0	1,9 a B	3,5 a A	4,8 a A	3,4 a A	97,92 a
1,5	1,7 a A	2,8 a A	2,5 b A	3,0 a A	97,92 a

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

TCLts = "thin cell layer" transversais TCLIs= "thin cell layer" longitudinais

Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey $P \geq 0,05$.

FONTE: A autora (2020).

A análise de variância indicou que a interação entre o tipo de explante e a concentração de Spd foi significativa para as variáveis: porcentagem de explante que regeneraram ESPs e número médio de raízes. Para o número médio de ESPs, apenas o tipo de explante teve influência significativa. Para a variável porcentagem de enraizamento o tipo de explante e a concentração de Spd apresentaram efeitos significativos. Para os protocormos inteiros não houve diferença significativa entre os tratamentos para formação de plântulas, após 90 dias do segundo subcultivo (ANEXO 4).

Os TCLts apicais apresentaram elevadas porcentagens de regeneração de ESPs em todos os tratamentos com Spd, seguidos de TCLls, sendo que os protocormos inteiros e TCLts basais apresentaram baixas porcentagens de regeneração (TABELA 9, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

O número médio de raízes variou pouco entre os explantes testados, sendo que a melhor resposta ocorreu com TCLls significativamente superior ao dos protocormos inteiros e TCLts apicais (TABELA 9, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). O único tratamento que não houve a formação de raízes foi com a adição de 1,5 mM de Spd para TCLts basais (TABELA 9, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

TABELA 9 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs E NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMIDINA.

Tratamentos Espermidina (mM)	Explantes que regeneraram ESPs (%)				N° médio de raízes			
	Protocormos Inteiros	TCLts apicais	TCLts basais	TCLls	Protocormos inteiros	TCLts apicais	TCLts basais	TCLls
0	4,17 a D	83,33 a A	18,75 a C	54,17 a B	2,0 a A	2,9 a A	3,0 a A	3,1 a A
0,25	8,33 a C	97,92 a A	10,42 a C	64,58 a B	1,8 a A	2,5 a A	3,0 a A	2,9 a A
0,5	10,42 a C	100,00 a A	14,58 a C	68,75 a B	2,0 a A	2,8 a A	2,0 a A	2,9 a A
1,0	18,75 a C	100,00 a A	4,17 a D	60,42 a B	2,5 a A	2,9 a A	2,0 a A	3,5 a A
1,5	10,42 a C	91,67 a A	2,08 a C	58,33 a B	2,2 a B	2,3 a B	0,0 b C	3,3 a A

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

TCLts = “thin cell layer” transversais TCLls = “thin cell layer” longitudinais

Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, $P > 0,05$.

FONTE: A aurora (2020).

A porcentagem de enraizamento dos protocormos inteiros foi maior com adição de 0,5 mM do que com 1,5 mM de Spd (TABELA 10, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Os protocormos inteiros apresentaram elevadas porcentagens de formação de plântulas, independente da adição e concentração de Spd (TABELA 10, Teste de Tukey, $P > 0,05$).

TABELA 10 - RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESPs, EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri* APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMIDINA.

Tratamentos Espermidina (mM)	Enraizamento (%)	Formação de Plântulas (%)
		Protocormos inteiros
0	61,46 a b	95,83 a
0,25	65,63 a b	91,67 a
0,5	68,75 a	89,58 a
1,0	66,15 a b	81,25 a
1,5	59,38 b	89,58 a

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente, pelo Teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

FONTE: A autora (2020).

A comparação do tipo de explante indicou que protocormos inteiros apresentaram porcentagens de enraizamento significativamente superiores às dos TCLts apicais, TCLls e dos TCLts basais (TABELA 11, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$). Embora a porcentagem de regeneração de ESPs dos protocormos inteiros tenha sido baixa, foram esses explantes que apresentaram melhores respostas número médio de ESPs (3,5) (TABELA 11, Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

A análise conjunta das variáveis indicou que para a máxima regeneração de ESPs é recomendado o uso de TCLts apicais, cultivados em meio MSM/2, sem a adição de Spd (TABELAS 9 e 11; FIGURA 5F).

TABELA 11 - RESPOSTAS DO TIPO DE EXPLANTE NO ENRAIZAMENTO E DO NÚMERO MÉDIO DE ESPs EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO ESPERMIDINA.

Tipo de explante	Enraizamento (%)	Número médio de ESPs
Protocormos inteiros	99,17 a	3,5 a
TCLts apicais	91,67 b	2,3 b
TCLts basais	6,67 d	1,8 b c
TCLls	59,58 c	2,6 b

ESPs= estruturas semelhantes à protocormos; MSM/2 = MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

TCLts = “thin cell layer” transversais TCLls = “thin cell layer” longitudinais

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente, pelo Teste de Tukey. $P \leq 0,05$.

FONTE: A autora (2020).

3.3.3 Efeito da biomassa ou do extrato de *D. subspicatus* na regeneração de ESPs

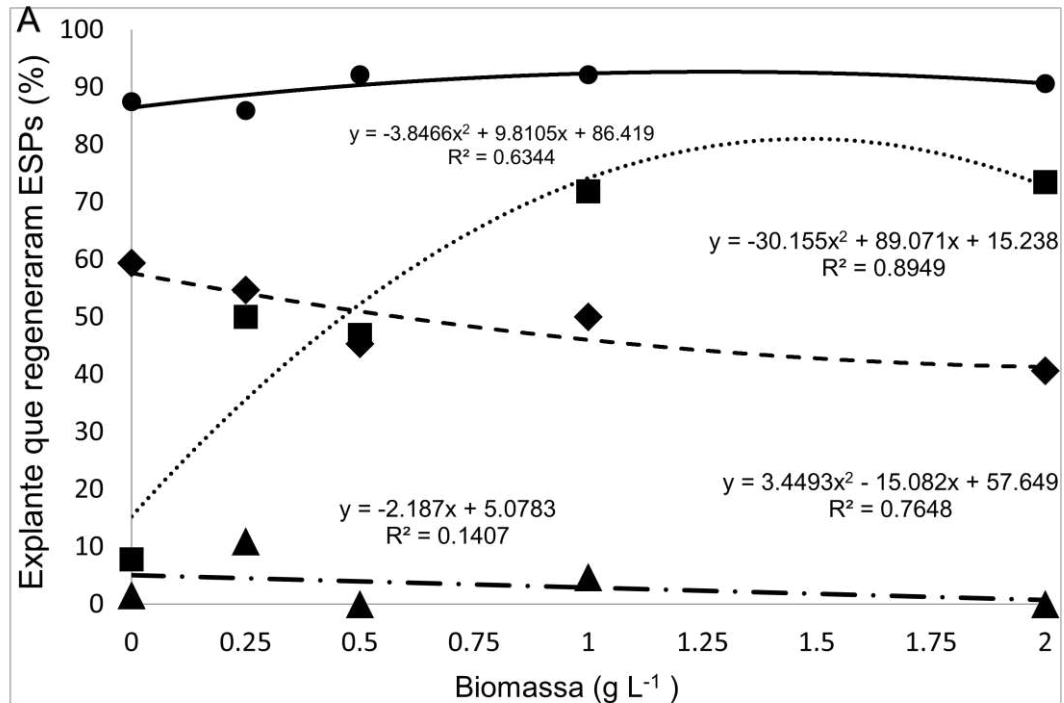
Os TCLts apicais foram os explantes com a maior taxa de regeneração de ESPs (acima 85%), seguido dos protocormos inteiros e dos TCLls e com as menores porcentagens obtidas para os TCLts basais (FIGURA 1A). A análise da figura 1A indicou que foram obtidas elevadas porcentagens de ESPs em TCLts apicais, independente da adição e concentração de biomassa. Da mesma forma, os TCLts basais não tiveram influência da adição de biomassa, no entanto, apresentaram as menores porcentagens de ESPs obtidas. Não é necessária a adição de biomassa para os TCLls e para os protocormos inteiros as melhores respostas ocorreriam se fosse adicionada $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa (FIGURA 1A). A concentração de biomassa só influenciou as porcentagens de regeneração de ESPs em protocormos inteiros, com maiores valores obtidos com as concentrações mais elevadas ($1 \text{ e } 2 \text{ g L}^{-1}$), com 71,88% e 73,44%, respectivamente, enquanto que sem adição de biomassa só ocorreu 7,81% (FIGURA 1A).

O número médio de ESPs foi maior nos TCLts apicais e TCLIs, com valores superiores ao do controle (sem adição de biomassa) (FIGURA 1B). Os resultados da figura 1B indicaram que os maiores números médios de ESPs ocorreriam com adição de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa para os TCLts apicais, TCLIs e protocormos inteiros e para os TCLts basais com $0,5 \text{ g L}^{-1}$.

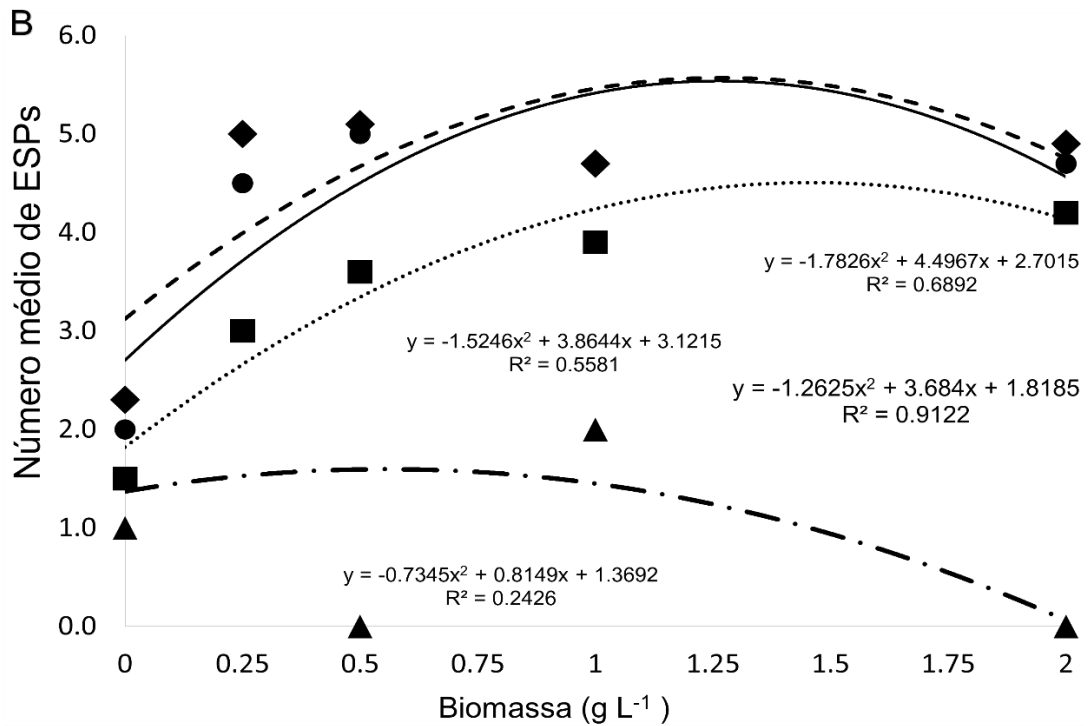
As porcentagens de enraizamento foram maiores para os TCLts apicais e protocormos inteiros e as melhores respostas ocorreram em meio sem adição de biomassa (FIGURA 2A). A análise da figura 2A indicou que a adição de biomassa não influenciou a porcentagem de enraizamento para nenhum tipo de explante. O número médio de raízes variou pouco entre os explantes testados, não sendo necessária a adição de biomassa e os menores valores foram obtidos para os TCLts basais (FIGURA 2B). Com os protocormos inteiros, a formação de plântulas foi maior no meio sem adição de biomassa (92,19%) e foi reduzindo à medida que aumentou a concentração (FIGURA 2C).

A análise conjunta dos resultados indicou que para maior regeneração de ESPs deve-se utilizar TCLts apicais e adicionar $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa de *D. subspicatus* no meio MSM/2 (FIGURA 5G). Os protocormos inteiros podem ser utilizados para regeneração de ESPs, recomendando-se adicionar $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa (FIGURA 5H). Os protocormos inteiros também regeneraram plântulas sem adição de biomassa.

FIGURA - 1 RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), CONTENDO BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.



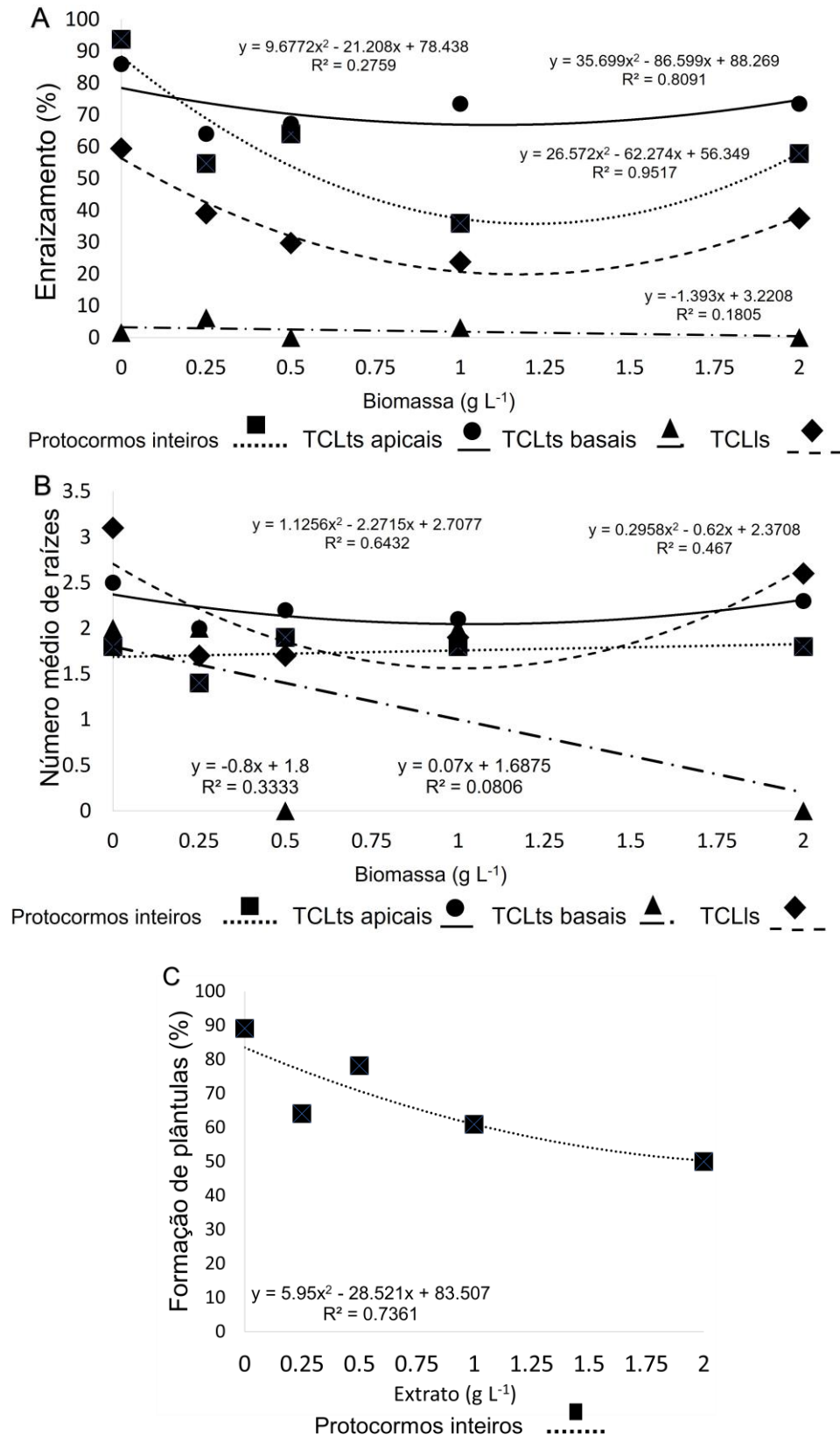
Protocormos inteiros TCLTs apicais TCLTs basais TCLIs



Protocormos inteiros TCLTs apicais TCLTs basais TCLIs

FONTE: A autora (2020).

FIGURA - 2 RESPOSTAS DE ENRAIZAMENTO DE ESTRUTURAS SEMELHANTES A PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), CONTENDO BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.



FONTE: A autora (2020).

Os TCLts apicais foram os explantes mais responsivos para a regeneração de ESPs (acima de 86%), não havendo diferenças entre as concentrações de extrato testadas, seguidos dos TCLIs, e os protocormos inteiros e TCLts basais apresentaram baixas porcentagens de regeneração (FIGURA 3A). A análise da Figura 2A indicou que não é necessário adicionar extrato para induzir regeneração de ESPs em TCLIs e TCLts basais, recomendando-se 1 g L⁻¹ para os TCLts apicais e 2 g L⁻¹ para os protocormos inteiros.

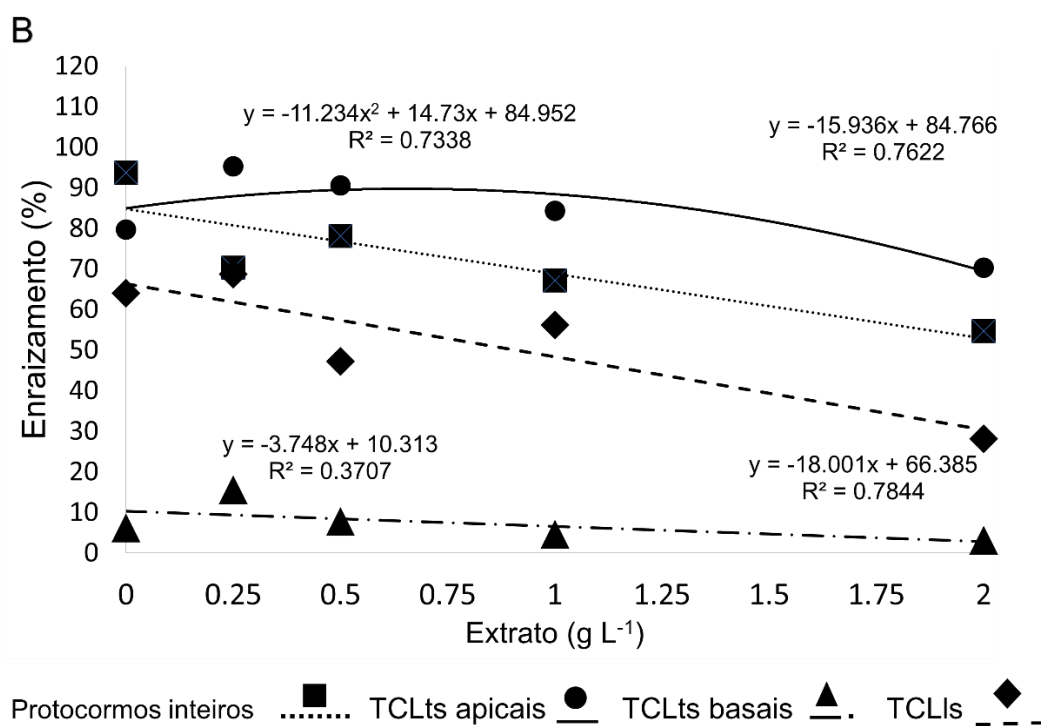
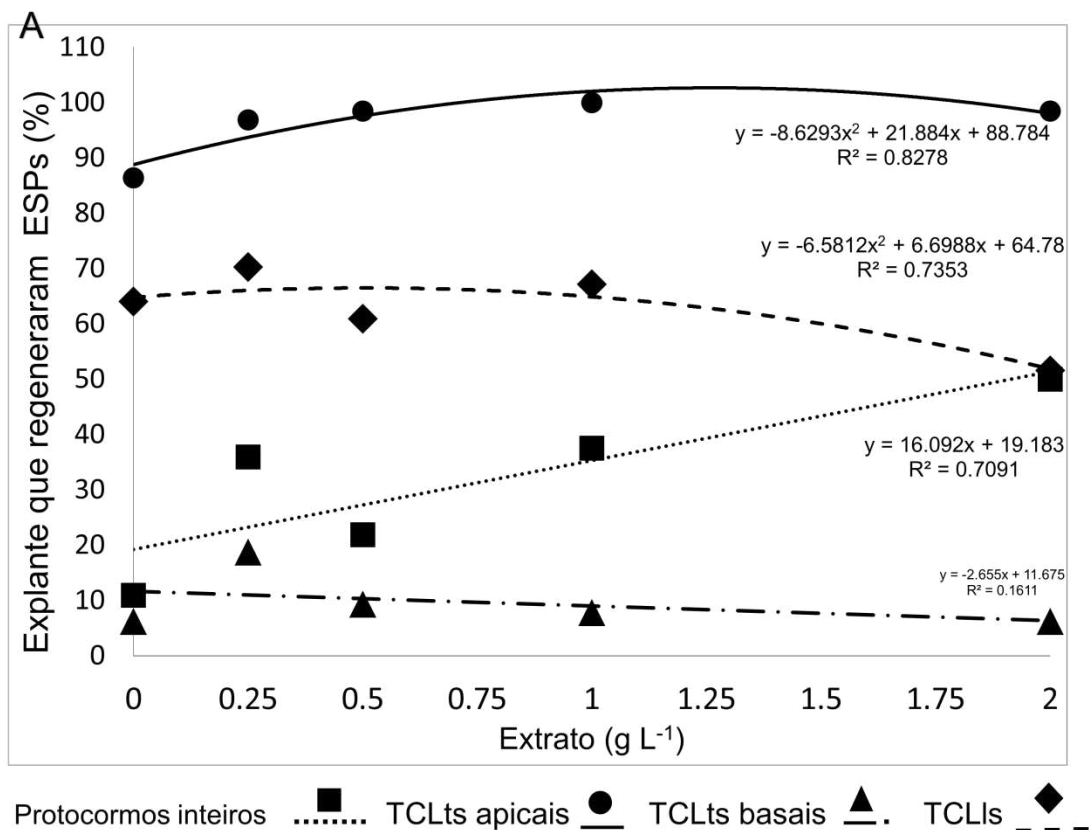
A porcentagem de enraizamento foi maior para os TCLts apicais, seguida da dos protocormos inteiros e dos TCLIs e os TCLts basais (15,63%) apresentaram as mais baixas porcentagens (FIGURA 3B). Não é necessário adicionar extrato para induzir enraizamento em protocormos inteiros, TCLIs e em TCLts basais e para os TCLts apicais não é recomendada a adição de concentração acima de 0,5 g L⁻¹ de extrato (FIGURA 3B).

O número médio de ESPs foi maior nos meios com adição de extrato e a análise da figura 4A indicou melhor resposta com 1 g L⁻¹ de extrato.

O número médio de raízes foi menor com adição de 2 g L⁻¹ de extrato (FIGURA 4B). A análise da figura 4B indicou que a adição de extrato não influenciou o número de raízes. A formação de plântulas nos protocormos inteiros foi maior nos tratamentos sem extrato do que com adição de 0,25; 1,0 e 2,0 g L⁻¹ (FIGURA 4C).

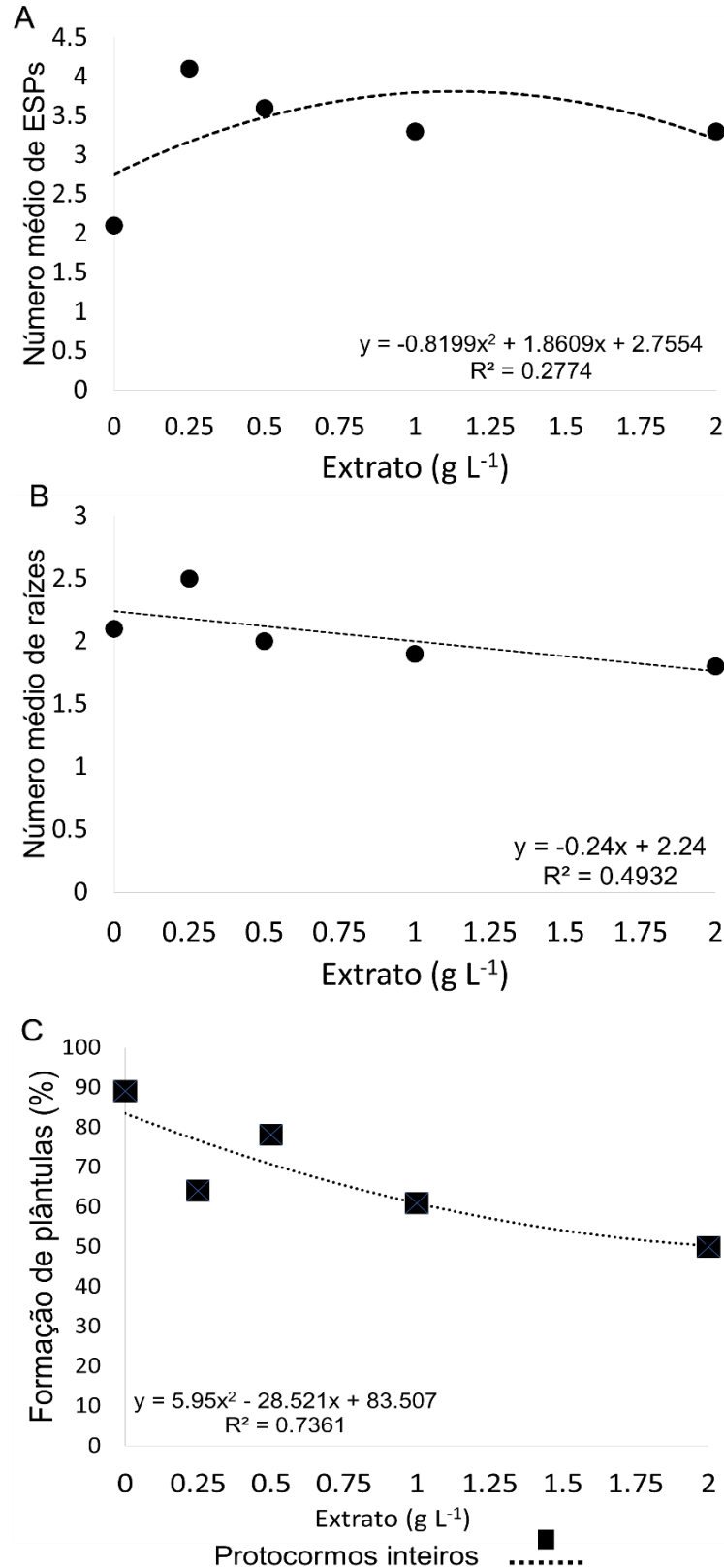
A análise conjunta das variáveis indicou que os TCLts apicais foram os explantes mais responsivos em meio de cultura MSM/2, contendo 1 g L⁻¹ de extrato da microalga (FIGURA 5I). Os protocormos inteiros induziram 50% de regeneração de ESPs, com adição de 2 g L⁻¹ de extrato. Não é necessário a adição de extrato no meio de cultura, quando protocormos inteiros são utilizados para a formação de plântulas.

FIGURA – 3 RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) CONTENDO EXTRATO DA MICROALGA *Desmodemus subspicatus*.



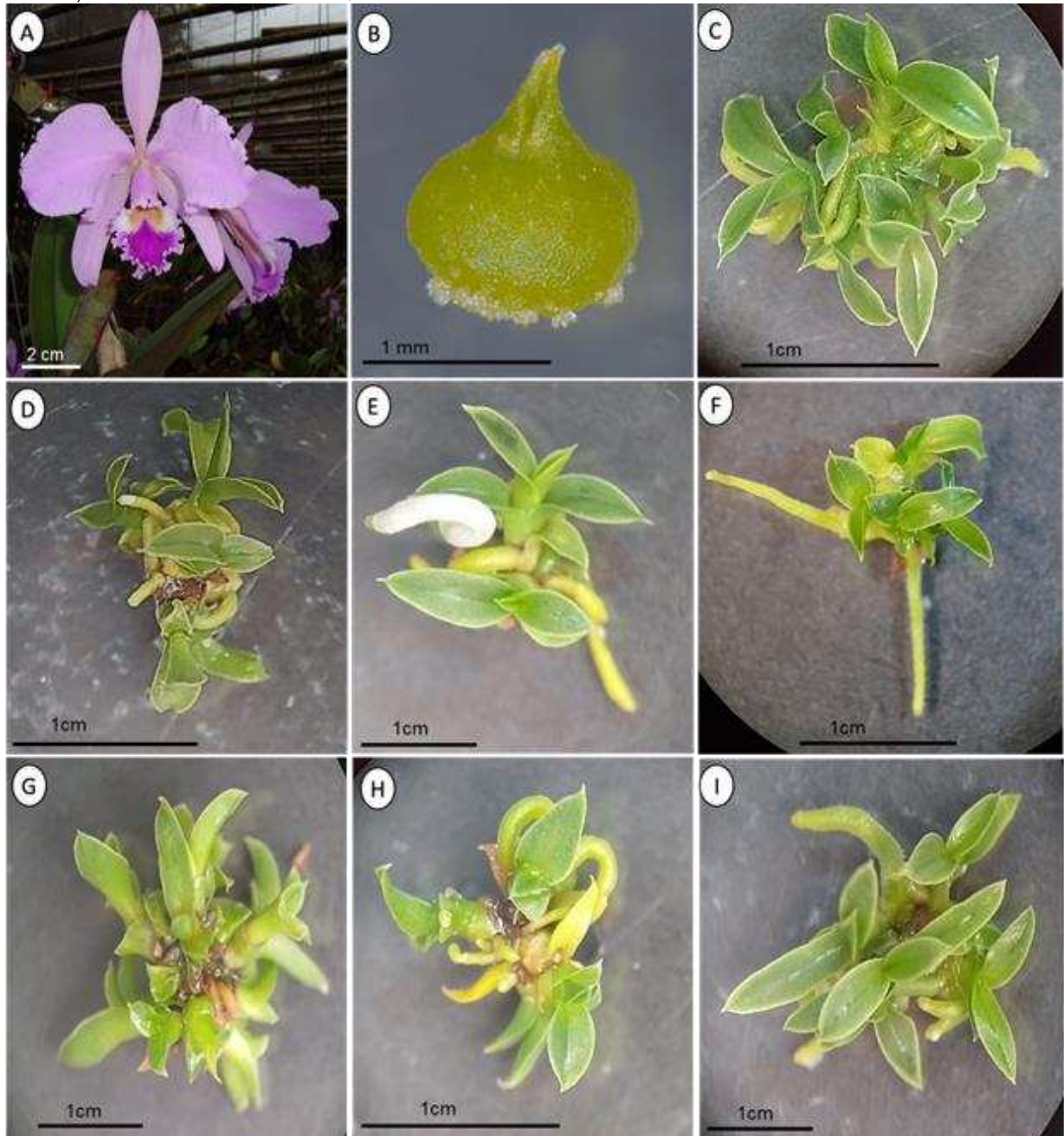
FONTE: A autora (2020).

FIGURA – 4 RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) EM EXPLANTES DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) CONTENDO EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.



FONTE: A autora (2020).

FIGURA – 5 REGENERAÇÃO DE DE ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS (ESPs) DE *Cattleya warneri*, APÓS 120 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE): **A** - PLANTA MADURA, **B** – PROTOCORMO COM ÁPICE UTILIZADO NA TÉCNICA DE ‘THIN CELL LAYER” (TCL), **C** – TCLt APICAL CULTIVADO EM MEIO COM 8 μ M DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), **D** – TCLt APICAL CULTIVADO SEM ADIÇÃO DE PUTRESCINA, **E**- TCLt APICAL, CULTIVADO EM MEIO SEM ADIÇÃO DE ESPERMINA, **F** – TCLt APICAL CULTIVADO SEM ADIÇÃO DE ESPERMIDINA, **G** – TCLT APICAL CULTIVADO COM 1,0 g L⁻¹ DE BIOMASSA DE *Desmodemus subspicatus*, **H** – PROTOCORMO INTEIRO CULTIVADO COM 1,0 g L⁻¹ DE BIOMASSA, **I** - TCLt APICAL CULTIVADO COM 1,0 G L⁻¹ DE EXTRATO AQUOSO.



FONTE: A autora (2020).

3.4 EFEITO DO CARVÃO ATIVADO NO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO

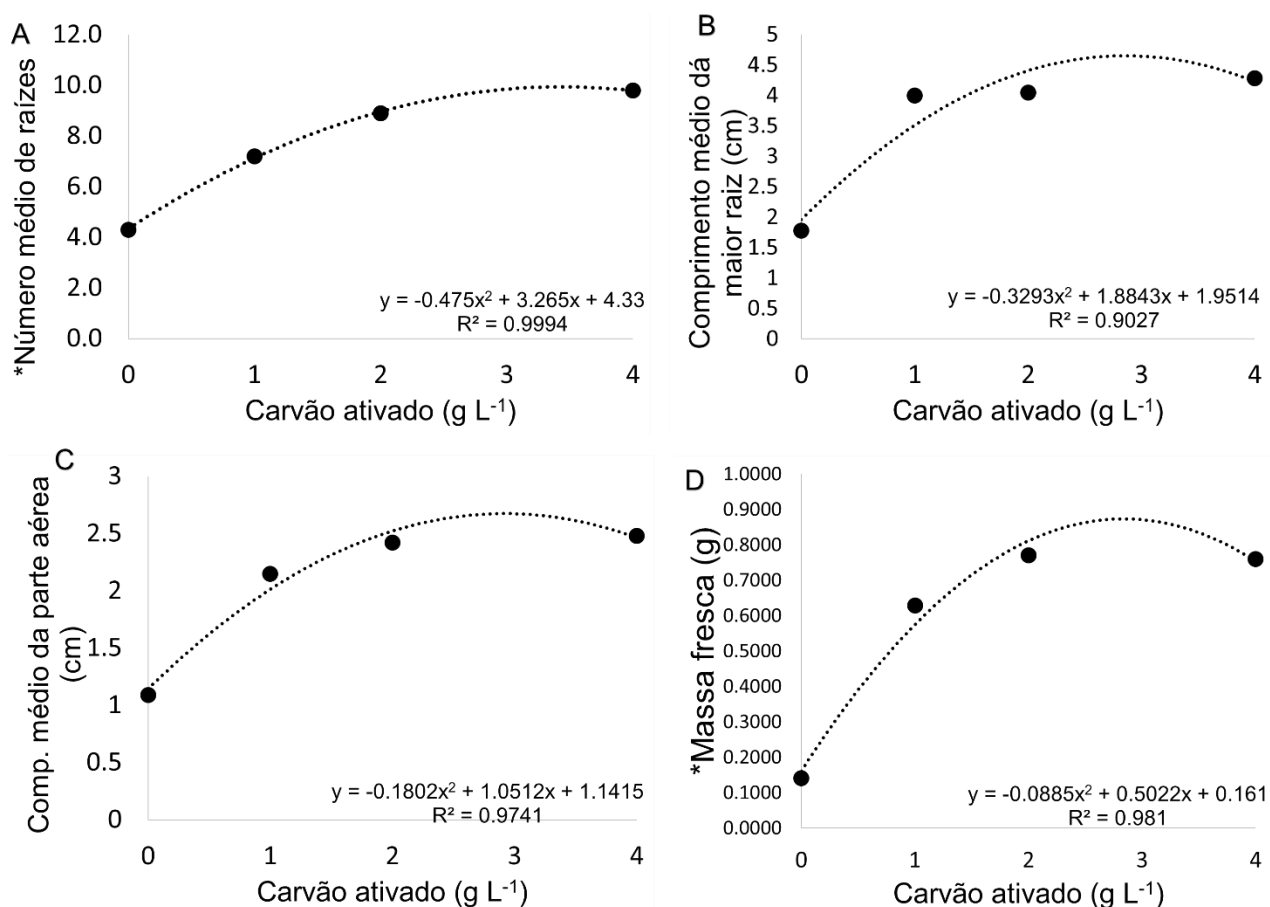
3.4.1 *Explantos oriundos de TCLs cultivados com reguladores do crescimento vegetais*

A porcentagem de enraizamento foi de 100%, independente da adição de carvão ativado. O número médio de raízes foi maior nas ESPs cultivadas com 4 g L⁻¹ de carvão, quando comparado com o de 1 g L⁻¹ e o do meio sem carvão ativado (FIGURA 6A). O comprimento médio da maior raiz foi superior em todos os tratamentos contendo carvão ativado (FIGURA 6B e 6A)

O comprimento da parte aérea dos explantes cultivados em meio com 4 g L⁻¹ de carvão ativado foi maior do que o dos meios sem carvão e com 1 g L⁻¹ (FIGURA 6C). A massa fresca foi superior nos tratamentos com carvão ativado (FIGURA 6D).

A análise conjunta das variáveis: número médio de raízes, comprimento médio da maior raiz, comprimento da parte aérea e massa fresca, indicou que a melhor resposta de alongamento da parte aérea e desenvolvimento de raízes ocorreria com adição de 3 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio MSM/2 (FIGURA 9A).

FIGURA 6 - ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE ESPs ESTRUTURAS SEMELHANTES À PROTOCORMOS ORIUNDOS DA TCL DE PROTOCORMOS DE *Cattleya warneri* CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A METADE DA CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES), ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO.



*Dados do número médio de raízes foram transformados para log10 e da massa fresca para raiz quadrada ($\sqrt{}$).

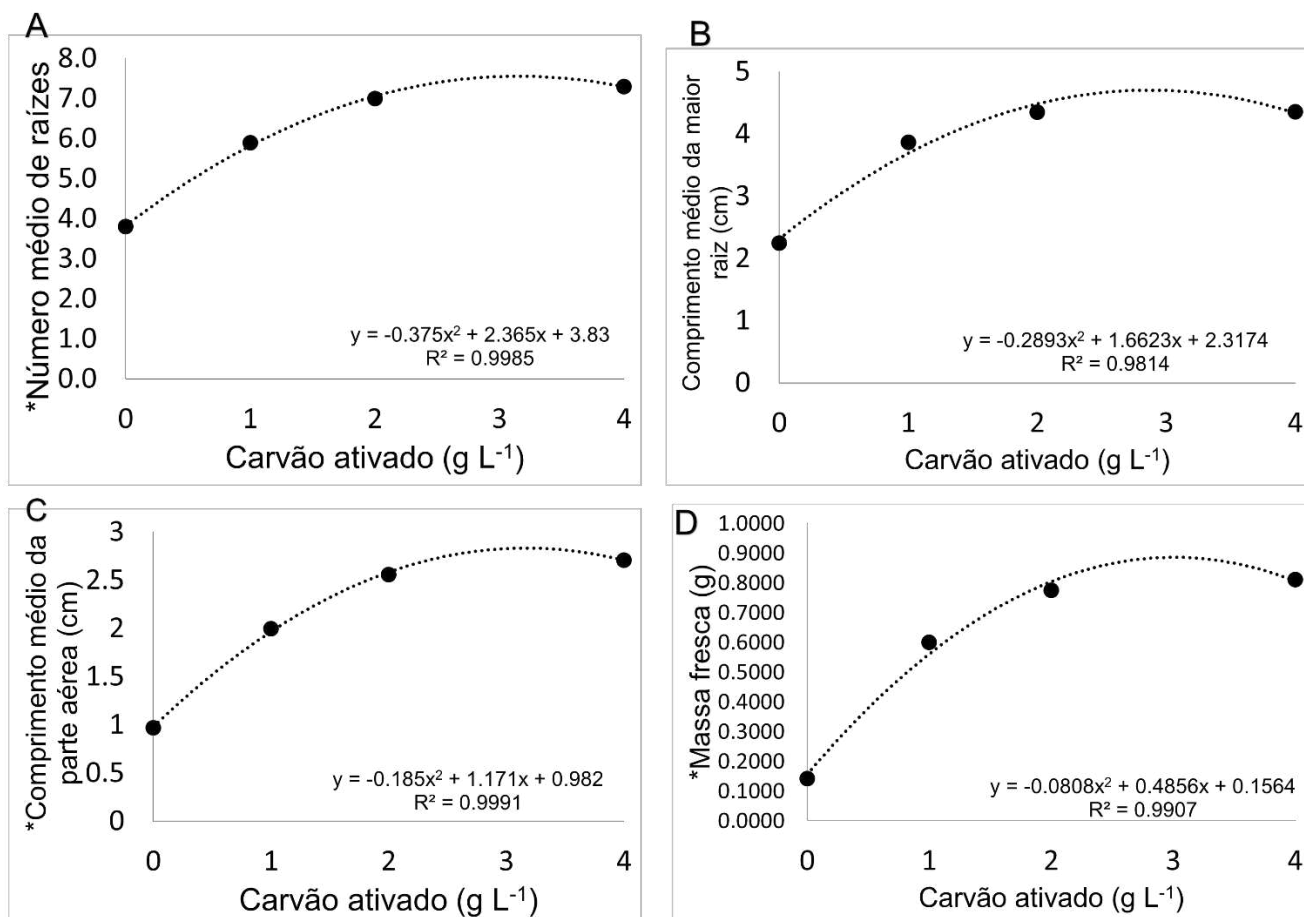
FONTE: A autora (2020).

3.4.2 Explantes oriundos de TCLs cultivados com PAs

Todos os explantes apresentaram 100% de enraizamento. As ESPs cultivadas em meio com 2 e 4 g L⁻¹ de carvão ativado apresentaram maiores números e comprimentos médios de raízes, comprimento da parte aérea e massa fresca do que os obtidos com 1 g L⁻¹ e a pior resposta ocorreu no meio sem carvão ativado (FIGURAS 7A, 7B e 9B).

A análise conjunta das variáveis (Figuras 7A-7D) recomenda a adição de 3 g L⁻¹ de carvão ativado para promover alongamento e desenvolvimento de raízes.

FIGURA - 7 - ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES ORIUNDOS DE TCL ('THIN CELL LAYER') DE PROTOCORMOS DE *Cattleya warneri* CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



*Dados foram transformados para log10: A – número médio de raízes, B – comprimento médio da parte aérea e E – massa fresca.

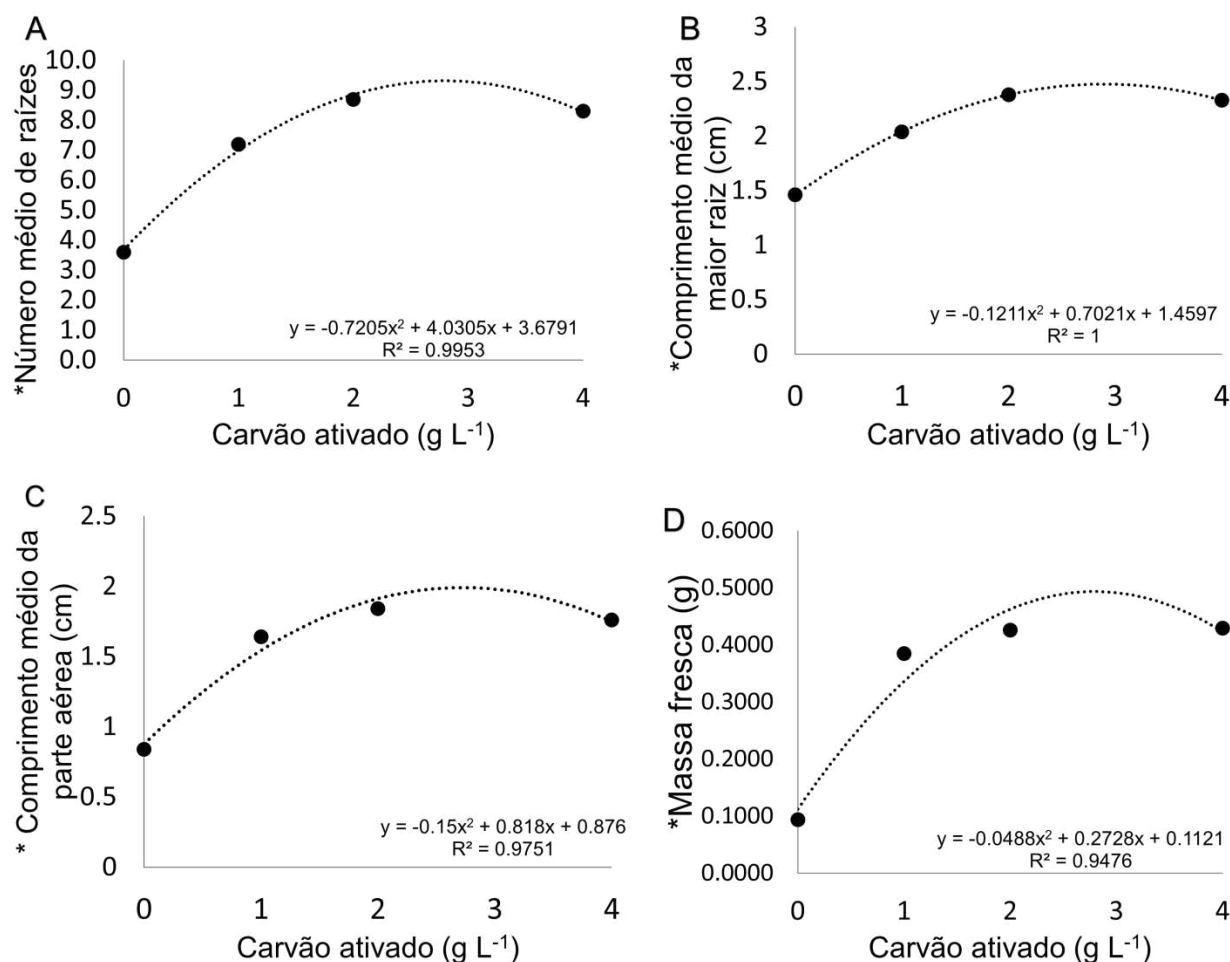
FONTE: A autora (2020).

3.4.3 Explantes oriundos de TCL cultivados com biomassa e extrato aquoso da microalga *D. subspicatus*

Os explantes apresentaram 100% de enraizamento. Para todas as variáveis avaliadas a adição do carvão ativado apresentou resultados significativamente superiores aos dos explantes cultivados em meio sem adição de carvão (FIGURA 7A-9C).

A análise conjunta das variáveis (FIGURAS 8A-8D) recomenda a adição de 3 g L⁻¹ de carvão ativado para promover o alongamento e desenvolvimento de raízes.

FIGURA 8 - ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri* ORIUNDOS DE EXPERIMENTO DE TCL, COM ADIÇÃO DE BIOMASSA E EXTRATO DE *Desmodemus subspicatus* E CULTIVADOS POR 120 DIAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE) e ACRESCIDO DE CARVÃO ATIVADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.



*Dados do número médio de raízes, comprimento médio da parte aérea e massa fresca foram transformados para \log_{10} e do comprimento médio da maior raiz para raiz quadrada ($\sqrt{}$)

FONTE: A autora (2020).

3.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS

3.5.1 Explantes oriundos de TCLs cultivados com reguladores de crescimento vegetais e alongados com carvão ativado.

A porcentagem de sobrevivência após 120 dias de permanência na casa de vegetação não apresentou diferença significativa entre os substratos testados (ANEXO 6). As porcentagens de sobrevivência obtidas foram superiores a 90% (TABELA 12, FIGURA 9D, Teste de Tukey, $P > 0,05$).

TABELA 12 – SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri*, ORIUNDAS DE TCLs CULTIVADOS EM MEIO MSM/2, CONTENDO REGULADORES VEGETAIS, SEGUIDO DE ALONGAMENTO COM ADIÇÃO DE CARVÃO VEGETAL NO MEIO DE CULTURA MSM/2, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 120 DIAS.

Substratos	Sobrevivência (%)
Esfagno	93,13 a
Vermiculita	97,50 a
Esfagno + casca de pinus (1:1, v/v)	96,88 a
Casca de pinus + carvão + fibra de coco (1:1:1, v/v)	90,63 a

TCL= "thin cell layer"; MSM/2= meio MS, com os macronutrientes reduzidos pela metade

Dados transformados para Qui-quadrado (χ^2)

Letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey. $P>0,05$.

FONTE: A autora (2020).

3.5.2 Explantes oriundos de TCLs cultivados com poliaminas e alongados com carvão ativado.

A porcentagem de sobrevivência obtida após 90 dias de aclimatização em casa de vegetação não apresentou diferenças significativas entre os substratos testados (ANEXO 7). As plantas transplantadas nos substratos testados apresentaram elevadas porcentagens de sobrevivência, acima de 96% (TABELA 13, Teste de Tukey, $P>0,05$).

TABELA 13 – SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri*, ORIUNDAS DE TCLs CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA MSM/2, CONTENDO POLIAMINAS, ALONGADAS COM ADIÇÃO DE CARVÃO ATIVADO, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 120 DIAS.

Substratos	Sobrevivência (%)
Esfagno	97,50 a
Vermiculita*	98,61 a
Esfagno + casca de pinus (1:1, v/v)	96,25 a
Casca de pinus + carvão + fibra de coco (1:1:1 v/v)	96,25 a
Vermiculita + casca de pinus (1:1, v/v)	97,50 a
Vermiculita + fibra de coco (1:1, v/v)	98,75 a

TCL= "thin cell layer"; MSM/2= meio MS, com os macronutrientes reduzidos pela metade

Dados transformados em Qui-quadrado (χ^2)

* Vermiculita de granulometria fina Eucatex®

Letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey. $P>0,05$.

FONTE: A autora (2020).

3.5.3 Explantes oriundos de TCLs cultivados com biomassa e extrato de *D. subspicatus* e alongados com carvão ativado.

A porcentagem de sobrevivência após 90 dias apresentou diferenças significativas entre os substratos testados (ANEXO 8). As mudas plantadas em substrato comercial Forth® apresentaram porcentagem de sobrevivência superior quando comparada com às de esfagno ou com o substrato comercial Maxfertil® (TABELA 14, $P \leq 0,05$).

TABELA 14 – SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri*, ORIUNDAS DE TCLs CULTIVADOS EM MEIO MSM/2, CONTENDO MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*, ALONGADAS EM MEIO COM CARVÃO ATIVADO, TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 120 DIAS.

Substratos	Sobrevivência (%)
Esfagno	85,00 b
Maxfertil®	82,50 b
Esfagno + casca de pinus (1:1, v/v)	90,63 a b
Forth®	98,75 a

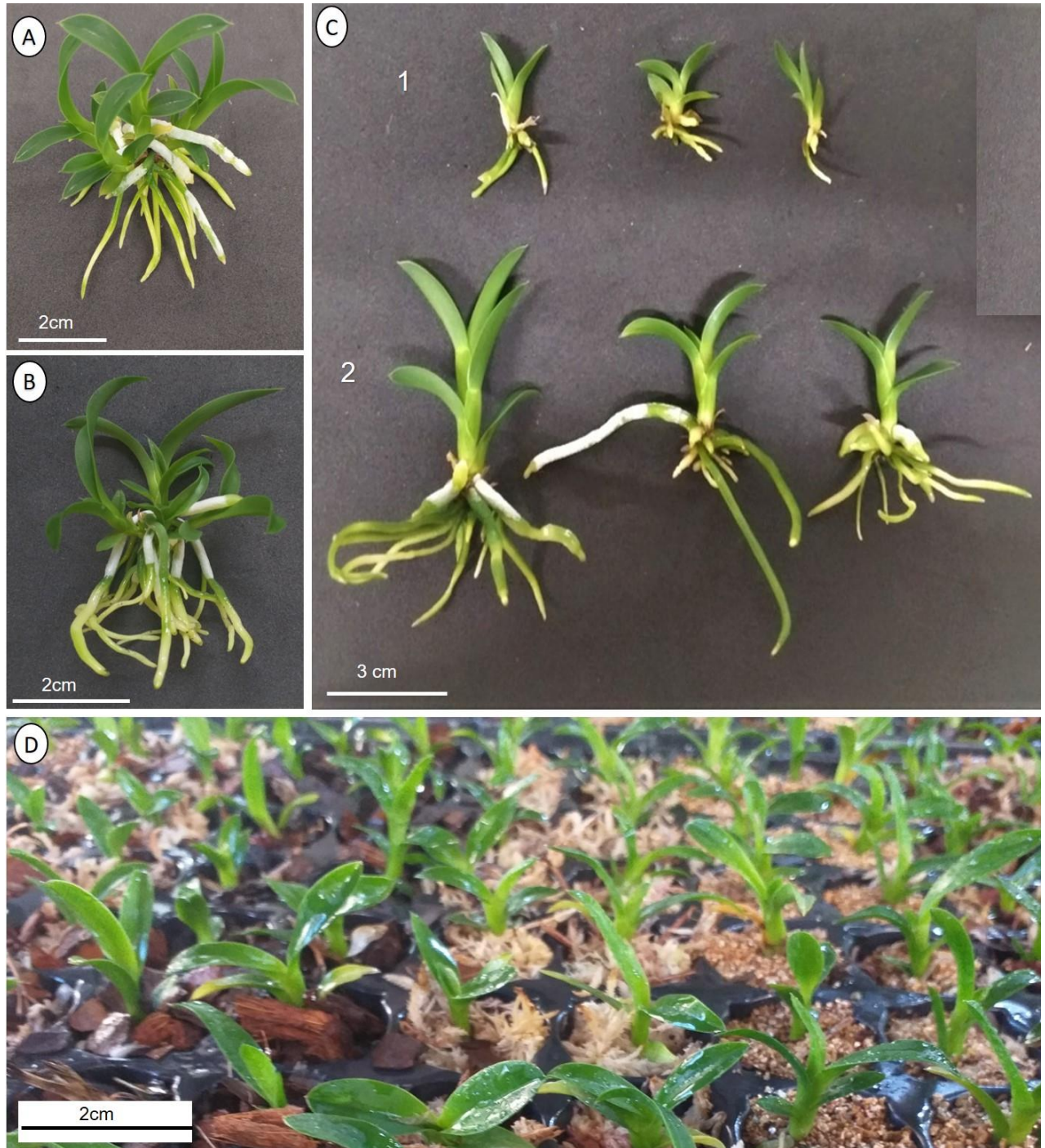
TCL= "thin cell layer"; MSM/2= meio MS, com os macronutrientes reduzidos pela metade

Dados transformados em Qui-quadrado (χ^2)

Letras minúsculas iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey. $P > 0,05$.

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 9 – A LONGAMENTO, ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE EXPLANTES DE *Cattleya warneri* ORIUNDOS DOS EXPERIMENTOS DE TCL ("THIN CELL LAYER"): **A – B** EXPLANTES A LONGADOS EM MEIO MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE,) COM ADIÇÃO 2 E 4 g L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO RESPECTIVAMENTE, **C** – PLANTAS INDIVIDUALIZADAS: 1- MEIO SEM ADIÇÃO DE CARVÃO ATIVADO E 2 – PLANTAS APÓS O A LONGAMENTO EM MEIO COM CARVÃO ATIVADO, **D** – ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS APÓS 120 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.



FONTE: A autora (2020).

4 DISCUSSÃO

O protocormo demonstrou ser um explante eficiente para a propagação *in vitro* de *C. warneri* respondendo mesmo na ausência de regulador vegetal. Os protocormos, resultantes da germinação das orquídeas, são uma fase intermediária entre o embrião e a planta, sendo uma excelente fonte de explante para a regeneração de ESPs (YEUNG, 2017). A principal resposta obtida pelos protocormos inteiros de *C. warneri* foi de regeneração de plântulas (superior a 90%), na ausência de reguladores de crescimento vegetais, PAs ou microalgas. A formação do meristema apical é a primeira estrutura formada pelo protocormo, seguida dos primórdios foliares e posteriormente a formação de raiz, resultando em uma planta funcional (YEUNG *et al.*, 2018), como foi observado no presente estudo. Resposta semelhante foi obtida com protocormos inteiros de *Cattleya labiata*, que com a adição de biomassa e extrato da microalga *Messastrum gracile* apresentaram elevadas porcentagens de formação de plântulas (76% e 60% respectivamente) (CORBELLINI *et al.*, 2020).

Os protocormos inteiros foram menos eficientes que os TCLs para a regeneração de ESPs. No experimento com reguladores do crescimento vegetais, a melhor resposta ocorreu no meio contendo 8 μM de BAP (47,92% e 1,9 ESPs), com adição de PAs, a porcentagem máxima não atingiu 10% e com extrato de *D. subspicatus* (2 g L⁻¹) foi obtido 50% e 3,3 ESPs. De todos os tratamentos testados, a melhor resposta ocorreu com 1 e 2 g L⁻¹ de biomassa (71,88% e 73,44% e 4,7 ESPs). Resultados superiores foram obtidos por Mata-Rosas e Baltazar-García (2011), com elevadas porcentagens de regeneração de protocormos inteiros (90,3% e 89,7%) em meio MS suplementado com 4,44 e 8,87 μM de BAP em combinação com 0,54 μM de ANA, na propagação *in vitro* de *Oncidium tigrinum*. A adição de biomassa de *Messastrum gracile* no meio MSM/2, também proporcionou maior regeneração de ESPs de *C. labiata* (59%), sendo que não houve diferença entre as concentrações testadas (0,5 a 4,0 g L⁻¹) (CORBELLINI *et al.*, 2020).

Na análise da composição de biomassa seca da microalga *D. subspicatus*, constatou-se a presença de carboidratos, proteínas, lipídios e zeatina, sendo que os esses compostos orgânicos foram detectados em maiores concentrações do que para o extrato. Além disso, no extrato não foram detectados lipídios e a concentração de zeatina foi mais de seis vezes maior, quando comparada com a de

biomassa. Provavelmente, os compostos orgânicos estimularam uma maior produção de ESPs nos protocormos inteiros em meio contendo biomassa. Stirk *et al.* (2013) após quantificar compostos químicos em 24 cepas de microalgas, dentre elas, a do mesmo gênero deste estudo *Desmodesmus armatus* (R. Chodat) verificaram a presença de citocininas e também de auxinas, que não foram detectadas no presente estudo. Essa resposta das microalgas na regeneração de ESPs indicou que elas possuem um grande potencial como bioestimulante na cultura de tecidos.

A técnica de TCL utilizada com protocormos de 90 e 120 dias obtidos a partir da germinação de sementes *in vitro* é uma alternativa eficiente para propagação de plantas de *C. warneri*. As divisões rápidas ocorrem naturalmente na zona meristemática dos protocormos e permitem melhores respostas dos reguladores de crescimento vegetal aplicados exogenamente (YEUNG, 2017). Outra vantagem dessa técnica é que os explantes têm maior contato com o meio de cultura e, com isso, aumenta a capacidade de absorver nutrientes, possibilitando uma maior propagação massal (TEIXEIRA DA SILVA e DOBRÁNSZKI, 2014). Outra explicação é que quando são realizadas as secções finas nos explantes, a resposta ao estresse pode induzir a formação e diferenciação de ESPs (MATA-ROSAS e BALTAZAR-GARCÍA, 2011; TEIXEIRA DA SILVA e DOBRÁNSZKI, 2019).

Os TCLts apicais foram os explantes mais responsivos, pois apresentaram maiores porcentagens de regeneração de ESPs de *C. warneri*, seguidos dos TCLls, enquanto os TCLts basais obtiveram pouca resposta de regeneração. Segundo Yeung *et al.* (2018), as células da extremidade apical dos protocormos são meristemáticas e menores quando comparadas com as da região basal e isso pode ter favorecido a melhor resposta que ocorreu com os TCLts apicais de *C. warneri*. Um resultado semelhante foi obtido para TCLs de *Hadrolaelia grandis* em que secções de TCLts apicais de protocormos de dois meses também produziram uma taxa de regeneração de ESPs mais alta do que TCLts basais durante o cultivo inicial (VUDALA *et al.*, 2019). Corbellini *et al.* (2020) também constataram que os TCLts apicais de *Cattleya labiata* apresentaram maiores porcentagens de regeneração do que os TCLls e TCLts basais. Os TCLts basais de *C. warneri* escureceram nas primeiras semanas de cultivo, nos experimentos com reguladores do crescimento vegetal, de PAs e de microalgas e isso pode ter ocorrido por causa do dano causado aos tecidos no momento de realizar a secção. Resultado diferente foi obtido por

Mata-Rosas e Baltazar-García (2011) com TCLIs de protocormos de *Oncidium tigrinum*, com apenas 19,8% de regeneração de ESPs em meio MS.

Os TCLts apicais e TCLs longitudinais de protocormos de 90 dias, cultivados com 8 µM BAP mostraram melhor resposta em porcentagem de explantes que regeneraram ESPs (89% e 87%% respectivamente) e número médio (5,2 e 4,8 ESPs). As citocininas promovem a divisão celular, proliferação e morfogênese de brotos (HAN *et al.*, 2018), com isso, essa resposta de maior regeneração com BAP já era esperada. A melhor concentração de BAP tem variado conforme a espécie. Respostas semelhantes foram obtidas por GOMES *et al.* (2015) com protocormos de 180 dias de *Brasilidium forbesii* com TCLIs cultivados em um meio contendo 2,0 µM BAP produziu a mais alta porcentagem de ESPs (77%), com um total de 22,7 ESPs por explante. Pereira *et al.*, (2018) recomendaram a adição de 22 µM de BAP para induzir brotos de *Schomburgkia crista*, concentração bem mais elevada do que a utilizada no presente estudo.

Das PAs testadas com os TCLs cultivados em meio contendo Put, Spm ou Spd a resposta de regeneração de ESPs foi semelhante à do controle, não sendo indicada essa suplementação no meio MSM/2. As poliaminas podem melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas por causa de seus efeitos na divisão e diferenciação nas células (ABBASI *et al.*, 2017) resultados que foram observados neste estudo, com altas porcentagens de regeneração em TCLts apicais. Resultados diferentes deste estudo foram obtidos em brotos de *Dendrobium*, com adição de 1,0 mM de Spd aumentou a produção inicial de brotos em 100% após quatro semanas de cultivo (KUMARI e GEORGE, 2011). Ao contrário do que foi observado no nosso estudo, Mandal *et al.* (2020) constataram que a adição de 1,0 mM de Put e Spm proporcionou 60% de regeneração direta de brotos de *Dendrobium* e o número médio de brotos foi de 6,0 e 1,3 por explante respectivamente.

Alguns estudos utilizaram poliaminas combinadas com reguladores vegetais para uma maior regeneração e multiplicação de ESPs. A combinação de 25 µM de Spd com 5 µM de BAP foi indicada para melhorar a multiplicação de explantes de *Spathoglottis plicata* (YASIN *et al.*, 2015). No nosso estudo só avaliamos as respostas de reguladores vegetais e poliaminas isolados, sendo necessários experimentos da combinação para verificar o efeito na regeneração de ESPs de *C. warneri*.

A suplementação de biomassa e extrato aquoso de *D. subspicatus* demonstrou efeito positivo na regeneração de ESPs de *C. warneri*. As melhores respostas ocorreram com adição de 1,5 g L⁻¹ de biomassa ao meio de cultura MSM/2 (92% de regeneração e 4,7 ESPs por explante), e com adição de 1,0 g L⁻¹ de extrato promoveu 100% de regeneração e 3,3 ESPs em TCLts apicais. Esses resultados indicaram que a adição de biomassa ou do extrato podem substituir os reguladores vegetais clássicos na indução e regeneração de ESPs. Resultados promissores também foram observados com TCL de *Cattleya labiata*, com a adição de 0,5 g L⁻¹ de biomassa da microalga *Messastrum gracile* e 0,5 g L⁻¹ de extrato de *Chlorella vulgaris* ocorreu 59% de regeneração de ESPs e 4 ESPs e 35% com 8 ESPs por explante, respectivamente (CORBELLINI *et al.*, 2020). Ao contrário do que foi observado nesse estudo, a adição da microalga *Chlorella sorokiniana* não foi eficiente para substituir a adição de BAP ao meio de cultura usado para indução de brotos de *Schomburgkia crispa* (PEREIRA *et al.*, 2018).

Na etapa de alongamento os ESPs de *C. warneri* enraizaram em todos os meios testados na ausência ou presença de carvão ativado. Entretanto, a concentração de 3,0 g L⁻¹ carvão ativado foi recomendada pela análise de regressão para ser adicionada no meio MSM/2. Os explantes cultivados em meio de cultura semi-sólido, contendo carvão apresentaram melhores respostas de alongamento da parte aérea, massa fresca e raízes, quando comparado com o meio sem adição. De acordo com Thomas (2008) uns dos efeitos do carvão ativado é de adsorver substâncias inibidoras liberadas pelos meios ou pelos explantes promovendo maior alongamento e enraizamento e isso foi constatado nesse estudo. A concentração ótima de carvão ativado tem variado conforme a espécie. Resultados semelhantes foram obtidos no alongamento de ESPs de *Brasiliidium forbesii* com adição de 3,0 g L⁻¹ carvão ativado (GOMES *et al.*, 2015), ou com 1,0 g L⁻¹ para *Hadrolaelia grandis* (VUDALA *et al.*, 2019) e com 2,0 g L⁻¹ para *Cattleya labiata* (CORBELLINI *et al.*, 2020).

As plantas de *C. warneri* apresentaram elevadas porcentagens de sobrevivência em casa de vegetação em todos os substratos testados (acima de 85%), sendo necessário avaliar outras variáveis, como comprimento da parte aérea, de raiz e massa fresca para recomendar o mais apropriado. Os mesmos substratos foram indicados para outras espécies de orquídeas como vermiculita para *Brasiliidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015) e *Brasiliorchis picta* (DOS SANTOS *et al.*,

2016), casca de pinus e fibra de coco para *Cattleya forbesii* e *Cattleya bowringiana* (COLOMBO *et al.*, 2017) e esfagno para *Cattleya labiata* (CORBELLINI *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÕES

Foi estabelecido um protocolo eficiente de micropropagação para *C. warneri* utilizando a técnica TCL. O tipo de secção e as concentrações de reguladores de crescimento vegetais e de extrato aquoso ou biomassa de *D. subspicatus* influenciaram as respostas de regeneração de ESPs. TCLts apicais de protocormos de 90 a 120 dias são recomendados para essa técnica pois foram os explantes que apresentaram elevadas porcentagens de regeneração de ESPs, enquanto que os, TCLts basais não são indicados, pois ocorreu elevadas porcentagens de mortalidade.

A regeneração de ESPs foi mais eficiente com adição de 8 μM de BAP, de 1 g L⁻¹ de biomassa ou 1,5 g L⁻¹ de extrato de *D. subspicatus* no meio MSM/2. As microalgas são alternativas eficazes para substituir os reguladores vegetais convencionais adicionados no meio de cultura.

Os protocormos inteiros apresentaram elevadas porcentagens de formação de plântulas, com exceção dos cultivados no meio MSM/2, suplementado com 1,0 g L⁻¹ de biomassa que também foram induzidas elevadas porcentagens de ESPs.

Para promover o alongamento da parte aérea e desenvolvimento de raízes, recomenda-se adicionar 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura. Plantas apresentaram elevadas porcentagens de sobrevivência em casa de vegetação em todos os substratos testados (acima de 85%), sendo necessários estudos futuros para avaliar outras variáveis (massa fresca e comprimento da parte aérea) e indicar com mais precisão o melhor substrato.

6 REFERÊNCIAS

- ABBASI N. A.; ALI I.; HAFIZ, I. A.; KHAN, A. S. Application of polyamines in horticulture: a review. **International Journal of Biosciences**, v. 10, p. 319-342, 2017.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water**, 21^a ed, Washington: American Public Health Association, 2005.
- BHATTACHARYYA, P.; KUMARIA, S.; JOB, N.; TANDON, P. En-masse production of elite clones of *Dendrobium crepidatum*: a threatened, medicinal orchid used in Traditional Chinese Medicine (TCM). **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3. p. 168–176, 2016.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARDOSO, J. C.; ZANELLO, C. A.; CHEN, J. T. An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. **International Journal Molecular Sciences**, v. 21, p. 1-43, 2020.
- CHEN, D.; SHAO, Q.; YIN, L.; YOUNIS, A.; ZHENG, B. Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-13 2019.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.
- CNCFlora. *Cattleya warneri* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya warneri](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya%20warneri)>. Acesso em 31 maio 2020.
- COLOMBO, R. C.; HOSHINO, R. T.; FERRARI, E. A. P.; ALVES, G. A. C.; FARIA R. T. *Cattleya forbesii* x *Cattleya bowringiana*: a new hybrid of *Cattleya* orchid. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 184-186, 2017.
- CORBELLINI, J. R.; RIBAS L. L. F.; MAIA F. R.; CORRÊA, D. O.; NOSEDA M. D.; SUZUKI, R. M.; AMANO E. Effect of microalgae *Messastrum gracile* and *Chlorella vulgaris* on the in vitro propagation of orchid *Cattleya labiata*, **Journal of Applied Phycology**, <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02251-9> 2020

CORRÊA, D. O.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Biomass production and harvesting of *Desmodesmus subspicatus* cultivated in flat plate photobioreactor using chitosan as flocculant agent. **Journal of Applied Phycology**, <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1586-z>, 2018.

DOS SANTOS, S. A.; SMIDT, E. C.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 134-144, 2016.

DUBOIS, M.; GILLES K. A.; HAMILTON J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 3, p. 350–356, 1956.

EKMEKÇİGİL, M.; BAYRAKTAR, M.; AKKUŞ, O.; GÜREL, A. High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, p. 451–464, 2019.

GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.

GUPTA, A. Studies on *Malaxis acuminata* D. don (= *Microstylis wallichii* Lindl.) a medicinally important orchid. **Journal of Global Research Computer Science and Technology**, v. 4, p. 1-11, 2016.

HAN, X.; ZENG, H.; BARTOCCI, P.; FANTOZZI, F.; YAN, Y. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review. **Fermentation**, v. 4 p. 1-15, 2018.

HOSOMI, S. T.; SANTOS, R. B.; CUSTÓDIO, C. C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R.; MACHADO-NETO, N. B. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 139, p. 178-189, 2011.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KUMARI, I. P.; GEORGE, T. S. In vitro clonal shoot morphogenesis of commercial *Dendrobium* orchid cultivars in polyamines supplemented medium. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 49 p.118-120, 2011.

MA, X.; LIU, J.; LIU, B.; CHEN, T.; YANG, B.; CHEN, F. Physiological and biochemical changes reveal stress-associated photosynthetic carbon partitioning into triacylglycerol in the oleaginous marine alga *Nannochloropsis oculata*. **Algal Research**, v. 16, p. 28–35, 2016.

MANDAL, S.; PAL, N.; MONDAL, T.; BANERJEE N. Comparative Efficiency Analysis of Different Explants and Contribution of Polyamines on *in vitro* Propagation of *Dendrobium Hybrid Sonia*. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 30, p. 77-86, 2020.

MATA-ROSAS, M.; BALTAZAR-GARCÍA, J. In vitro regeneration through direct organogenesis from protocorms of *Oncidium tigrinum* Llave & Lex. (Orchidaceae), an endemic and threatened Mexican species. **HortScience**, v. 46 p. 1132–1135, 2011.

MERCADO S. A. A.; CONTRERAS N. A. V. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb.f. (Orchidaceae). **Acta Agronómica**, v. 66, p. 544-548, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NICHOLS, H. W.; BOLD H. C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. **Journal of Phycology**, v. 1, p. 34-38, 1965.

PAEK K.; Y. HAHN E. J.; PARK S. Y. Micropropagation of *Phalaenopsis* orchids via protocorms and protocorm-like bodies. **Methods in Molecular Biology**, v. 710, p. 293–306, 2011.

PEREIRA, N. S.; FERREIRA, B. R. R.; CARVALHO, E. M; DAMIANI, C. R. Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2347–2358, 2018.

RODRIGUES, D. B.; NADAL, M. C.; CAMARGO, S. S.; ASSIS, A. M.; SCHUCH, M. W.; PEIL, R. M. N.; FARIA, R. T. Growth regulators and substrates for *Oncidium baueri* Lindl. micropropagation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 2901-2910, 2016.

RONGA, D.; BIAZZI, E.; PARATI, K.; CARMINATI, D.; CARMINATI, E.; TAVA, A. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. **Agronomy**, v. 9. p. 6-22, 2019.

STIRK, W. A.; ÖRDÖG V.; NOVÁK, O.; ROLCIK, J.; STRNAD, M.; BÁLINT P.; VAN STADEN J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v. 49, p 459–467, 2013.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Dissecting the concept of the thin cell layer: theoretical basis and practical application of the plant growth correction factor to apple, *Cymbidium* and *Chrysanthemum*. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 881- 895, 2014.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Recent advances and novelties in the thin cell layer-based plant biotechnology – a mini-review, **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 100. p 89–96. 2019.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 618–631, 2008.

VETTORAZZI, R. G.; CARVALHO, V. S.; TEIXEIRA, M. C.; CAMPOSTRINI, E.; CUNHA, M.; DE MATOS, M. E.; VICCINI, L. F. Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*. **Scientia Horticulturae**, v. 256, p. 1-12. 2019.

VUDALA, S. M.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **South African Journal of Botany**, v. 121 p.76-82, 2019.

WATTANAPAN, N.; NUALSRI, C.; MEESAWAT, U. *In vitro* propagation through transverse thin cell layer (tTCL) culture system of lady's slipper orchid: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 40, p. 306-313, 2018.

YASIN, Z. A. M; MAHMOOD, M.; SHAHARUDDIN, N. A. Effects of benzyladenine purine and its interaction with polyamines on growth of *Spathoglottis plicata* PLBs. **Turkish Journal of Botany**, v. 39. p. 245-252, 2015.

YEUNG, E. C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, v. 58, p.1-14, 2017.

YEUNG, E. C.; LI, Y. Y.; LEE, Y.I. Understanding seed and protocorm development in orchids. In: LEE, Y. I; YEUNG, E. C. (Eds.) **Orchid propagation: from laboratories to greenhouses – methods and protocols**, New York: Springer Protocols Handbooks, 2018. pp. 3-26.

ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T.; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Substratos alternativos ao esfagno na aclimatização de plântulas de *Arundina graminifolia* “alba” (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n.1, p. 7-12, 2014.

ANEXOS

CAPITULO 1

ANEXO 1 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Cattleya warneri*, CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA MSM/2 (MS, COM A CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE BIOMASSA E DE EXTRATO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* E ÉPOCAS DE SEMEADURA.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Biomassa: germinação total (%)	Extrato: germinação total (%)
Tratamentos	4	156,7136 *	8833,3452 *
Épocas	5	1039,2434 *	1116,1003 *
Tratamentos x Épocas	20	15,7135 *	71,6670 *
Coeficiente de variação (%)		2,19	3,78

* significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

GL= grau de liberdade

ANEXO 2 - EQUAÇÕES AJUSTADAS PARA GERMINAÇÃO DE *Cattleya warneri* EM FUNÇÃO DOS TRATAMENTOS CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA (B) E EXTRATO (E) (g L^{-1}) DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*, APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE SEMEADURA.

Tratamentos	Equações
B 0,00	$y = 1,1881x + 72,244, R^2 = 0,9444$
B 0,25	$y = -0,0692x^2 + 2,7532x + 73,28 R^2 = 0,8891$
B 0,50	$y = -0,0426x^2 + 1,838x + 80,113 R^2 = 0,8243$
B 1,00	$y = -0,0525x^2 + 2,0526x + 80,26 R^2 = 0,9129$
B 2,00	$y = -0,0547x^2 + 2,1289x + 80,1 R^2 = 0,9177$
E 0,00	$y = -0,0639x^2 + 2,842x + 68,9 R^2 = 0,9846$
E 0,25	$y = -0,0316x^2 + 1,3292x + 86,353 R^2 = 0,9491$
E 0,50	$y = -0,0603x^2 + 2,2904x + 79,16 R^2 = 0,953$
E 1,00	$y = -0,0267x^2 + 1,4303x + 70,113 R^2 = 0,9877$
E 2,00	$y = 1,5533x + 34,542 R^2 = 0,9785$

y=frequência de germinação de sementes, R^2 = coeficiente de determinação.

CAPITULO 2

ANEXO 1 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM ESPs, NÚMERO MÉDIO DE ESPs, PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES E PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS E DE *Cattleya warneri* APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO (90 DIAS) EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO BAP E ANA.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		Exp. que regeneraram ESPs (%)	Número médio de EPSs	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes	Formação de Plântulas (%)
Tipo de explante	3	43022,8226 *	70,3090 *	59230,0045*	103,8429 *	
Regulador	11	3723,3172 *	8,5026 *	2719,1427*	8,4821 ^{ns}	34452681,1*
Explante x Regulador	33	859,3914 *	10,0757 *	1132,2299*	4,7434 ^{ns}	
Coefficiente de variação (%)		42,75	47,12	36,00	66,52	43,73

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

GL= grau de liberdade

ESPs = estruturas semelhantes à protocormos,

MSM/2= meio MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

BAP= 6-benzilaminopurina; ANA= ácido naftalenoacético

ANEXO 2 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM ESPs, NÚMERO MÉDIO ESPs, PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES E PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri* APÓS O 2º SUBCULTIVO (90 DIAS) EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO PUTRESCINA.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		Explante que regeneraram EPSs (%)	Número médio de EPSs	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes	Formação de Plântulas (%)
Tipo de explante	3	42063,0544*	1,8841 ^{ns}	44818,9882*	8,8999 *	
Putrescina	4	571,0682*	2,7148 *	415,6199 ^{ns}	0,4131 ^{ns}	96,3542 ^{ns}
Explante x Putrescina	12	165,1127 ^{ns}	1,7719 *	222,9004 ^{ns}	1,1631 ^{ns}	
Coefficiente de variação (%)		38,32	35,31	24,21	37,77	8,81

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

GL= grau de liberdade

ESPs = estruturas semelhantes à protocormos,

MSM/2= meio MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

ANEXO 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM ESPs, NÚMERO MÉDIO DE ESPs, PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO DE RAIZES E PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri* APÓS O 2º SUBCULTIVO (90 DIAS) EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMINA.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		Explante que regeneraram EPSs (%)	Número médio de EPSs	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes	Formação de Plântulas (%)
Tipo de explante	3	45855,4688*	4,1478*	50334,6354*	7,4920 *	
Espermina	4	119,1406 ^{ns}	0,4994 ^{ns}	164,0625 ^{ns}	5,1747 *	226,5625 ^{ns}
Explante x Espermina	12	194,6615 ^{ns}	1,3126 ^{ns}	150,1736 ^{ns}	3,1010*	
Coefficiente de variação (%)		32,82	42,09	19,03	38,67	11,16

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

GL= grau de liberdade

ESPs = estruturas semelhantes à protocormos,

MSM/2= meio MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA PORCENTAGEM DE EXPLANTES QUE REGENERARAM ESPs, NÚMERO MÉDIO DE ESPs, PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO MÉDIO DE RAIZES E PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Cattleya warneri* APÓS O 2º SUBCULTIVO (90 DIAS) EM MEIO DE CULTURA MSM/2 CONTENDO ESPERMIDINA.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		Explante que regeneraram EPSs (%)	Número médio de EPSs	Enraizamento (%)	Nº médio de raízes	Formação de Plântulas (%)
Tipo de explante	3	51400,6076*	7,1173 *	53084,6354*	7,4316 *	
Espermidina	4	307,9427*	0,9637 ^{ns}	343,7500*	2,4698 *	169,2708 ^{ns}
Explante x Espermidina	12	216,7969*	0,8523 ^{ns}	196,1806 ^{ns}	2,2318 *	
Coefficiente de variação (%)		24,16	36,32	16,43	33,51	11,10

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

GL= grau de liberdade

ESPs = estruturas semelhantes à protocormos,

MSM/2= meio MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade

ANEXO 6 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* ORIUNTAS DE TCLs TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 120 DIAS

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio
		Sobrevivência (%)
Tratamento	3	5796203,61 ^{ns}
Erro Experimental	76	3274263,1
α		0,1600
Coefficiente de variação (%)		19,98

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

GL= grau de liberdade.

TCL= "thin cell layer"

ANEXO 7 – ANÁLISE DE VARIANCIA DA SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* ORIUNTAS DE TCLs TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 90 DIAS

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio Sobrevivência (%)
Tratamento	5	412760,417 ^{ns}
Erro Experimental	54	1251085,07
α		0,8927
Coeficiente de variação (%)		11,72

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

GL= grau de liberdade.

TCL= "thin cell layer"

ANEXO 8 – ANÁLISE DE VARIANCIA DA SOBREVIVENCIA DE PLANTAS DE *Cattleya warneri* ORIUNTAS DE TCLs TRANSPLANTADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS E ACLIMATIZADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO POR 90 DIAS

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio Sobrevivência (%)
Tratamento	3	25558573,40*
Erro Experimental	76	4971072,5
α		0,0027
Coeficiente de variação (%)		27,13

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

GL= grau de liberdade.

TCL= "thin cell layer"